

USO DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR *Salmonella* spp. EN SANIDAD ANIMAL

- TESIS DOCTORAL -



ANA LUCÍA SOLARTE PORTILLA
Córdoba, 2017

TITULO: *USO DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE LA
INFECCIÓN POR SALMONELLA SPP. EN SANIDAD ANIMAL*

AUTOR: *Ana Lucía Solarte Portilla*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**USO DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE LA
INFECCIÓN POR *Salmonella* spp. EN SANIDAD ANIMAL**

Presentada por:

Ana Lucía Solarte Portilla

Departamento de Sanidad Animal

Córdoba, España 2017



TÍTULO DE LA TESIS: USO DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR *Salmonella* spp. EN SANIDAD ANIMAL.

DOCTORANDA: Ana Lucía Solarte Portilla.

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis presentada por la doctoranda Dña. Ana Lucía Solarte Portilla, titulada en Medicina Veterinaria por la Universidad de Nariño (Colombia), se ha realizado dentro de la línea de investigación que el grupo PAI AGR256 de la Junta de Andalucía viene desarrollando desde hace dos décadas sobre el Estudio de alternativas naturales para el control de las infecciones animales. El principal objetivo de esta Tesis fue valorar el potencial de diversos aceites esenciales frente a un agente zoonótico de relevancia en Salud Pública y Sanidad Animal, como *Salmonella enterica*. El proyecto de investigación planteado supuso el aprendizaje y puesta a punto de nuevas técnicas microbiológicas y un arduo trabajo de laboratorio, actividades que la doctoranda desarrolló con notable eficiencia y profesionalidad, completando, si fue preciso, su formación con cursos especializados.

Los resultados obtenidos, de notable relevancia por su novedad y calidad científica, han sido aceptados para su divulgación en congresos de ámbito internacional (International Conference Antimicrobial Research, International Symposium of *Salmonella* and Salmonellosis, International Conference SAFEPOK), y la revista científica Foodborne Pathogens and Disease, indexada en Journal of Citation Reports (JCR) dentro del segundo cuartil. Asimismo, otros dos artículos derivados de la tesis se encuentran actualmente en revisión (Journal of Medicinal Food JCR Q2 y Microbial Drug Resistance JCR Q3).

Los hallazgos de esta Tesis apoyan la utilización de los aceites esenciales, solos o combinados con los antimicrobianos tradicionales, como medida para reducir la dispersión de cepas multirresistentes y el fracaso terapéutico, y abren la puerta a nuevas investigaciones en este campo siguiendo las líneas establecidas en el Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos. Consideramos que este trabajo reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 27 de octubre de 2017

Firma del/de los director/es

Fdo.: Dra. Belén Huerta Lorenzo

Fdo.: Dr. Rafael Astorga Márquez

Dedicada....

A Luisa y Mauricio

Agradecimientos....

Trascendentales momentos han dejado indelebles huellas en mi vida, huellas de risas y lágrimas que han marcado mi trasegar, mi historia; pero sin lugar a duda este es uno de esos momentos en que es justo agradecer a todos aquellos que de una y mil formas han sido cómplices de la vida para gestar este triunfo; no sin antes, mirar al cielo y dar gracias a Dios por su infinito amor, por poner en mi vida a personas maravillosas, que en tierras lejanas y mares distintos me hicieron sentir como en casa.

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis, Dra. Belén Huerta Lorenzo; excelente profesional e incansable defensora de sus ideales. Valoro su sensibilidad ante el sufrimiento, admiro su inteligencia, su excepcional memoria y su capacidad para transmitir el conocimiento, sin ningún tipo de egoísmo. Agradezco su apoyo incondicional no sólo para mí, sino para mi familia; agradezco su exigencia y rigurosidad, porque al final me han hecho ser más fuerte y segura.

A mi director, Dr. Rafael Jesús Astorga Márquez, investigador idóneo y consejero certero, que con la mayor voluntad me ha guiado en cada paso de este exigente proceso de Tesis Doctoral. Es un admirable intelectual, ordenado y metódico, matices que imprime a todos los aspectos de su vida por lo que es un digno ejemplo que imitar. Mil gracias por todas las enseñanzas, por las palabras de ánimo, por creer en mí e inculcarme las ganas de seguir adelante descubriendo “mundos posibles”.

Mis Agradecimientos al Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba (España), por haber dispuesto y facilitado todos los

medios necesarios para realizar este proyecto. A los Dres. Carmen Tarradas Iglesias, Alfonso Maldonado García e Inmaculada Luque Moreno, por inspirar con su carisma y calidez mi vocación por la sanidad animal y la salud pública, por aceptarme y hacerme sentir una más en su Grupo de Investigación, reciban mi total admiración y gratitud.

A la Dras. Mercedes Cousinou Rodríguez y Laura Redondo Sánchez del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, por sus excelentes orientaciones en el área de genómica y su constante disponibilidad para resolver mis dudas.

A la Dra. Cristina de Frutos, por apoyar la realización de esta tesis facilitando una muestra del cepario perteneciente al Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) Algete-Madrid.

A los Dres. Jaime Gómez, Fernando Cardoso y Lidia Gómez por brindarme su valiosa colaboración y motivar siempre con palabras de ánimo mi esfuerzo en esta valiosa experiencia de vida.

Agradezco a mis compañeras de Departamento, con quienes día a día he aprendido el valor de la amistad y que el trabajo en equipo es fundamental para lograr grandes objetivos; gracias por compartir sonrisas y palabras de motivación, que hicieron más amenas y provechosas las largas horas de trabajo. A Ángela Galán, mil gracias por su excepcional apoyo, amistad y cariño, siempre serás para mí un ejemplo de trabajo, generosidad y bondad; a Belén Barrero por su espontaneidad y alegría, por ser un modelo de meticulosidad y practicidad; y a Fabiana De Aguiar con quien comparto además de un continente, el gusto por el fascinante mundo de los aceites esenciales, agradezco su ayuda en el laboratorio, su optimismo y alegría “carioca”.

Gracias a todos los demás compañeros, investigadores, profesores y becarios del Departamento de Sanidad Animal, por su colaboración, solidaridad y siempre atenta escucha. Cada uno con su carisma y estilo dejaron impronta en esta exigente formación como investigadora.

A mi madre Ayda, mujer valiente, luchadora y fiel a sus creencias, que me ha enseñado el valor de la perseverancia y la dedicación, a quien debo el amor por la ciencia, y que me acompaña con sus bendiciones.

De corazón quiero dar las gracias a mi amado esposo Mauricio, compañero fiel de aventuras y guerrero de mil batallas, gracias por estar siempre a mi lado, porque con tus palabras me animaste para no desfallecer. Gracias por tu confianza y tu increíble forma de ser, por tu prudencia en el actuar y tu convicción en el sentir. Valoro todo tu esfuerzo y sacrificio, sé que no ha sido fácil, pero juntos venceremos cualquier obstáculo. Este triunfo es tan como tuyo como mío; recuerda que aquí comienza una nueva historia.

Infinitas gracias a mi bella e inteligente hija Luisa, mi obra maestra, la razón de mi vida, y mi fuerza. Gracias por tu paciencia, tu inmensa ternura, tu fortaleza, tu juicio prudente y honesto. Mi pequeña gran valiente, cuanto me enseñas día a día; tu capacidad de ver el mundo y lograr todo lo que te propones me llena de orgullo, has demostrado que los sueños se cumplen y que estas preparada para enfrentar a la vida, en el sitio que tú elijas, así sea lejos de mí; porque aunque miles de mares nos separen yo permaneceré siempre contigo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Capítulo I. Introducción General	2
Género <i>Salmonella</i>	2
Situación actual de la salmonelosis e importancia en salud pública	8
Uso de antimicrobianos y resistencias	13
Estudio de nuevos antimicrobianos para uso en veterinaria	27
Aceites esenciales (AE)	32
Capítulo II. Objetivos	57
Capítulo III. Objetivo 1	60
Capítulo IV. Objetivo 2	85
Capítulo V. Objetivo 3	102
Capítulo VI. Discusión General	123
Capítulo VII. Conclusiones	127
Capítulo VIII. Resumen/Summary	130
Capítulo IX. Divulgación y Aportaciones Científicas	140
Referencias Bibliográficas	152
Listado de Abreviaturas	189
Anexo 1	193
Anexo 2	197

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL



I. INTRODUCCIÓN GENERAL

GÉNERO *Salmonella*.

Salmonella es un género bacteriano perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacterias Gram negativas, catalasa positivas, negativas a la oxidasa y no formadoras de esporas; también son anaerobias facultativas. Casi todas las especies de *Salmonella* son móviles a través de flagelos peritricos (**Figura 1**), a excepción del patógeno en aves de corral *Salmonella enterica* serotipo Gallinarum (Lopes et al., 2016).

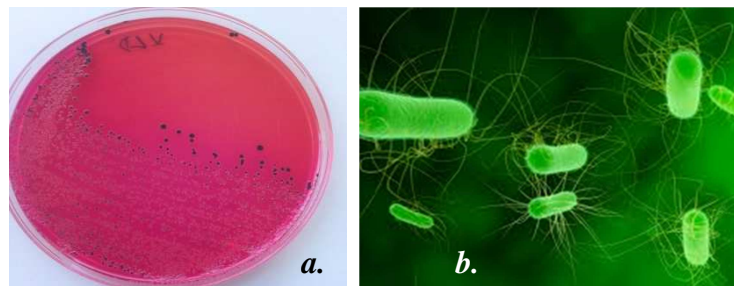


Figura 1. *Salmonella* spp. (a. Morfología de colonia; b. Vista microscópica)

Por lo general, las bacterias de *Salmonella* spp. pueden multiplicarse bajo diversas condiciones ambientales, incluso fuera del huésped vivo. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen a un rango de temperatura de 5 a 47° C con una temperatura óptima de 35 a 37°C, pero algunos pueden crecer a una temperatura de 2 a 4°C o hasta 54°C. Este género bacteriano requiere para su crecimiento de un pH de 3,8 y 9,5, con un pH óptimo de 6,5 a 7,5 (Adley & Ryan, 2016; D'Aoust & Maurer, 2007).

Hew et al. (2005), indican que una actividad acuosa (a_w) menor que 0,94 es inhibidora del crecimiento de *Salmonella*. Sin embargo, Aljarallah & Adams (2007) sugieren que a ciertas temperaturas una baja a_w tiene un efecto protector sobre este género bacteriano. Algunas de las características bioquímicas utilizadas para identificar *Salmonella* incluyen la producción de sulfuro de hidrógeno, la decarboxilación de la lisina y ornitina, y la ausencia de hidrólisis de la urea (D'Aoust & Maurer, 2007).

En términos de distribución, aunque fundamentalmente son bacterias intestinales, el género *Salmonella* está muy distribuido en el medio ambiente y puede causar una amplia gama de enfermedades tanto en humanos como en animales (Ryan et al., 2011).

Teniendo en cuenta que *Salmonella* spp. es uno de los principales patógenos infecciosos transmitidos por los alimentos que causan problemas sanitarios relevantes en todo el mundo, tanto en medicina humana como veterinaria, se considera importante ampliar la nomenclatura actual de este género (**Figura 2**).

En la actualidad, el género *Salmonella* se divide en sólo 2 especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, siendo *S. enterica* dividida en 6 subespecies adicionales (Ryan et al., 2017). Las cepas de *Salmonella* pertenecen a más de 50 serogrupos basados en el antígeno O, y a más de 2500 serotipos (cada uno con una combinación única de antígenos somáticos O y antígenos flagelar H1 y H2). La mayoría de serotipos de *Salmonella* pertenecen a una única subespecie de *Salmonella enterica*, y se asocian con más del 99% de las enfermedades causadas por este género bacteriano en humanos, incluyendo gastroenteritis y fiebre entérica (Chen et al., 2013).

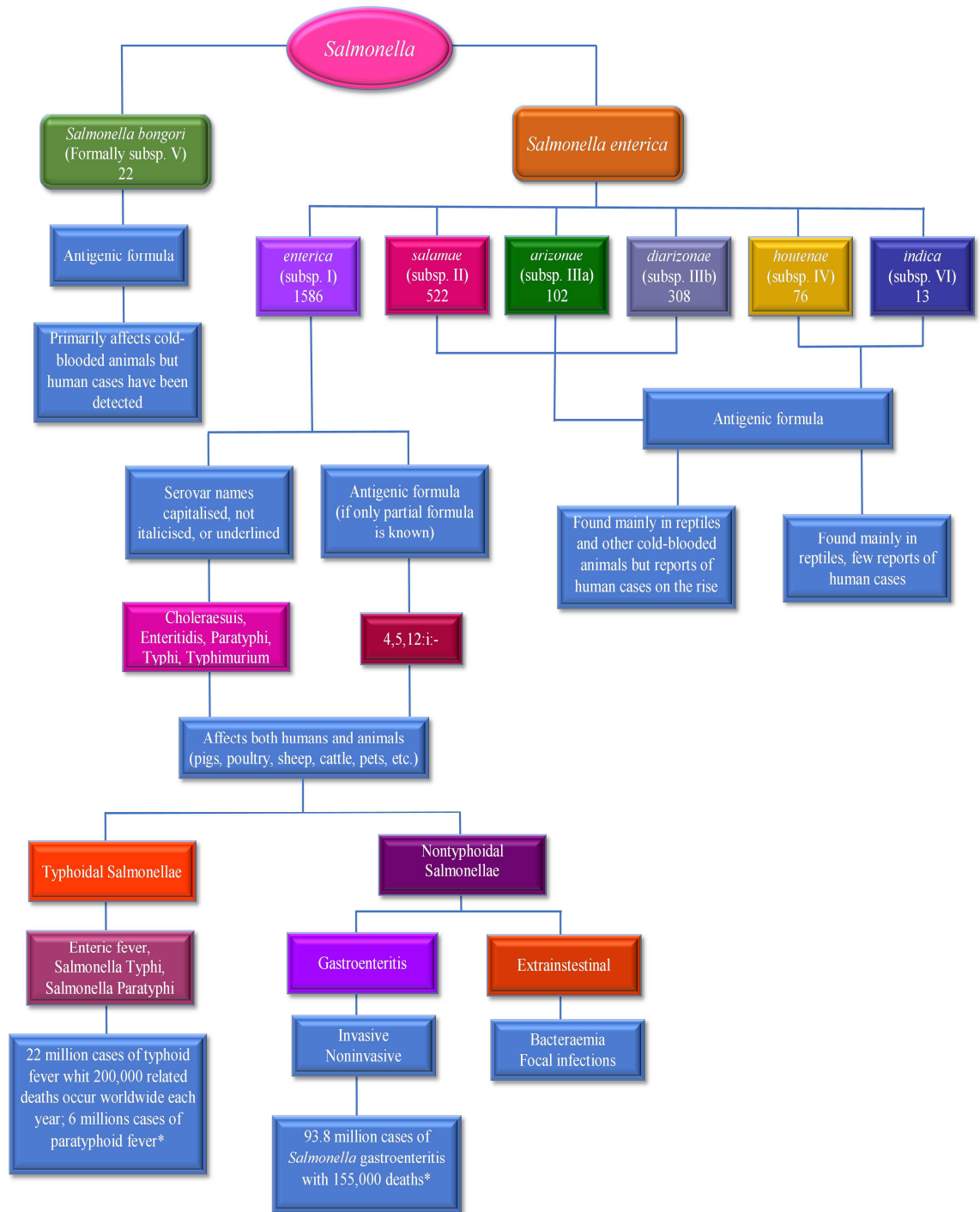


Figura 2. Nomenclatura del género *Salmonella* (European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC, 2016*; Majowicz et al., 2010*)

De la misma manera, gran parte de los serotipos reconocidos para este género no son patógenos en su hospedador natural, lo que significa que los animales suelen permanecer como portadores asintomáticos eliminando la bacteria en heces (Mith et al., 2014).

Varios serotipos de *Salmonella* se han aislado durante mucho tiempo del exterior de las cáscaras de huevo, pero *S. Enteritidis* puede estar presente dentro del huevo. Esta información sugiere la transmisión vertical (FDA, 2013).

Gran variedad de alimentos pueden estar contaminados con el serotipo Typhimurium, desde carnes y huevos hasta frutas y verduras, e incluso alimentos secos como especias y nueces crudas. Por otra parte, la enfermedad tifoidea suele asociarse con el agua potable contaminada con aguas residuales, o con cultivos irrigados con agua contaminada con aguas residuales. De este modo, la mayoría de toxiinfecciones en el hombre están asociadas al consumo de alimentos de origen animal y al consumo de frutas y verduras fertilizadas o regadas con desechos orgánicos (Echeita et al., 2011; FDA, 2013; Luz et al., 2014).

En términos generales, dependiendo del país y la especie los serotipos más prevalentes cambian, se considera en general que los principales serotipos implicados en los cuadros intestinales y sistémicos en salud pública son *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, de origen aviar y porcino (Dubois-Brissonnet et al., 2011). Es así como en la UE se considera a *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Infantis*, *Virchow* y *Hadar* los cinco serotipos más prevalentes del género *Salmonella* (EFSA & ECDC, 2016).

Algunas mascotas, como las tortugas y otros reptiles, y los pollitos, pueden vehicular *Salmonella*, que puede propagarse con todo aquello que entre en contacto con la mascota (FDA, 2013).

Las últimas investigaciones destacan además el contagio de *S. Typhimurium* a partir de cobayas utilizados como animales de compañía o como alimento para consumo humano en zonas del sur y centro de América (Bartholomew et al., 2014).

Si bien la exposición a *Salmonella* es frecuente, en la mayoría de los casos resulta necesario un inóculo grande (10^6 - 10^8 UFC) para el desarrollo de la enfermedad clínica; esta dosis es menor en individuos con factores de riesgo como edad, inmunodepresión, presencia de procesos subyacentes (leucemia, linfoma), o disminución de la acidez gástrica (Loynichan & Harris, 2005).

Durante la ingestión, *Salmonella* entra en las amígdalas en el paladar blando y persiste en las criptas tonsilares. Después de la ingestión, *Salmonella* debe sobrevivir a pH bajo (5-7) del estómago por la transcripción de los genes que codifican las proteínas de choque ácido. Las bacterias que sobreviven el paso a través del estómago, viajan al intestino delgado donde encuentran otros factores antibacterianos incluyendo las sales biliares, la lisozima y las defensinas. En las partes distales del intestino, la adhesión a la mucosa intestinal se acepta generalmente como el primer paso en la patogénesis de las infecciones por *Salmonella*. Varias adhesinas y fimbrias son necesarias para mediar la adherencia y, después de la adhesión, *Salmonella* atraviesa el epitelio intestinal utilizando diversos mecanismos, incluyendo la invasión de enterocitos adsorbentes, células M e incluso células globulares (Dunkley et al., 2009; Herrera, 2017).

La producción de diferentes enterotoxinas y citotoxinas provoca un cuadro clínico caracterizado por diarrea intensa, cianosis, fiebre elevada y potencialmente muerte por septicemia. Las principales lesiones corresponden a cuadros de colitis y gastritis acompañados de esplenomegalia y aumento del tamaño de los nódulos

linfáticos mesentéricos. En las aves, la colonización del intestino y el ovario por *S. Enteritidis* ocasiona sólo un proceso inflamatorio con descenso de los índices de conversión y alteración de la puesta (Coma, 2003; Gutiérrez, 2006).

Si la recuperación del cuadro agudo es incompleta o el animal ingiere dosis cercana a 10^6 UFC de *Salmonella* spp., se produce una infección subclínica en la que la bacteria se acantona en diversos tejidos del organismo (nódulos linfáticos ileocólicos, tonsilas, pulmones, ciego y colon), y puede ser eliminada por vía aerógena y por heces durante meses sin que el animal muestre ninguna sintomatología de la enfermedad. Estos portadores asintomáticos son importantes reservorios de la enfermedad y el principal foco de infección (González-Zorn et al., 2004).

SITUACIÓN ACTUAL DE LA SALMONELOSIS E IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

Las zoonosis son aquellas enfermedades que se transmiten directa o indirectamente entre los animales y el hombre. Las enfermedades zoonóticas transmitidas por los alimentos (ETA) han sido tradicionalmente una amenaza para la salud pública mundial. Ante esta problemática y como una de sus prioridades, la Unión Europea (UE) planteó la necesidad de garantizar un alto grado de seguridad alimentaria. Para ello, en diciembre del año 2000 publicó el libro blanco sobre seguridad alimentaria, que fue la base de mejoras legislativas organizativas y de coordinación entre los Estados Miembros (EM). La Directiva 2003/99/CE de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y el Reglamento 2160/2003/CE también de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos transmitidos por alimentos recoge un enfoque integrado de la seguridad alimentaria con un concepto que engloba toda la cadena de producción “*desde la granja hasta la mesa*” (EFSA, 2010).

A pesar de todo el esfuerzo llevado a cabo por las administraciones públicas en los países industrializados, se estima que hasta el diez por ciento de la población humana está en riesgo de sufrir alguna zoonosis alimentaria (Schlundt et al., 2004). En la UE, se han descrito un total de 4362 brotes de origen alimentario (incluidos los de transmisión a través del agua) durante el año 2015, que causaron 45874 casos humanos, 3892 hospitalizaciones y 17 muertes (EFSA & ECDC, 2016), aunque se estima que el número de afectados puede ser mucho mayor, ya que hay casos en los que no se realiza un diagnóstico final o no existe una vinculación directa con el alimento.

Además de suponer un peligro para la salud, los brotes de enfermedades originados por alimentos generan grandes pérdidas económicas, debido, entre otras causas a las repercusiones comerciales que sufre la industria de los alimentos involucrados. Según los datos recogidos en el último boletín de la EFSA & ECDC (2016), *Salmonella* spp. fue la principal responsable de estos brotes, asociados en su mayoría al consumo de huevos y ovoproductos (21,2%), seguidos por la carne de cerdo y derivados (13%).

Según datos EFSA & ECDC (2016), *Salmonella* se encuentra a la cabeza tanto de las principales zoonosis notificadas (**Figura 3a**) como de los brotes de toxiinfecciones alimentarias (**Figuras 3b y 3c**).

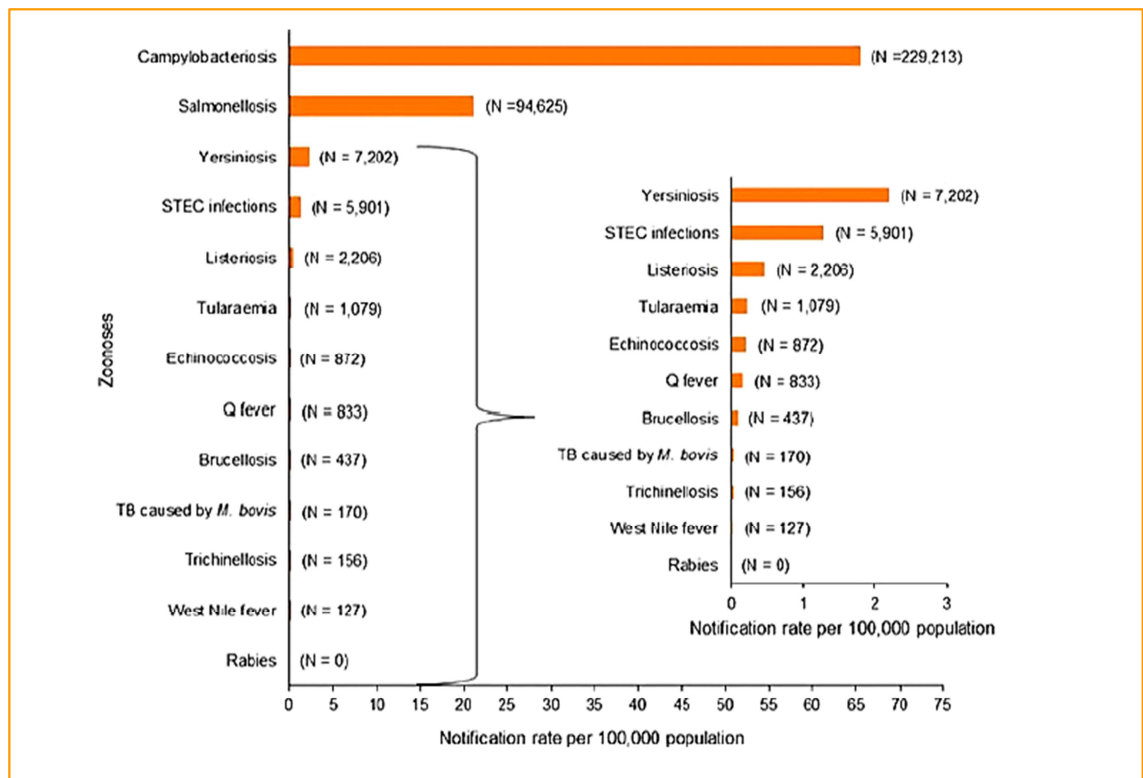


Figura.3a. Tasas de zoonosis notificadas a partir de casos humanos confirmados en la UE en 2015 (EFSA & ECDC, 2016)

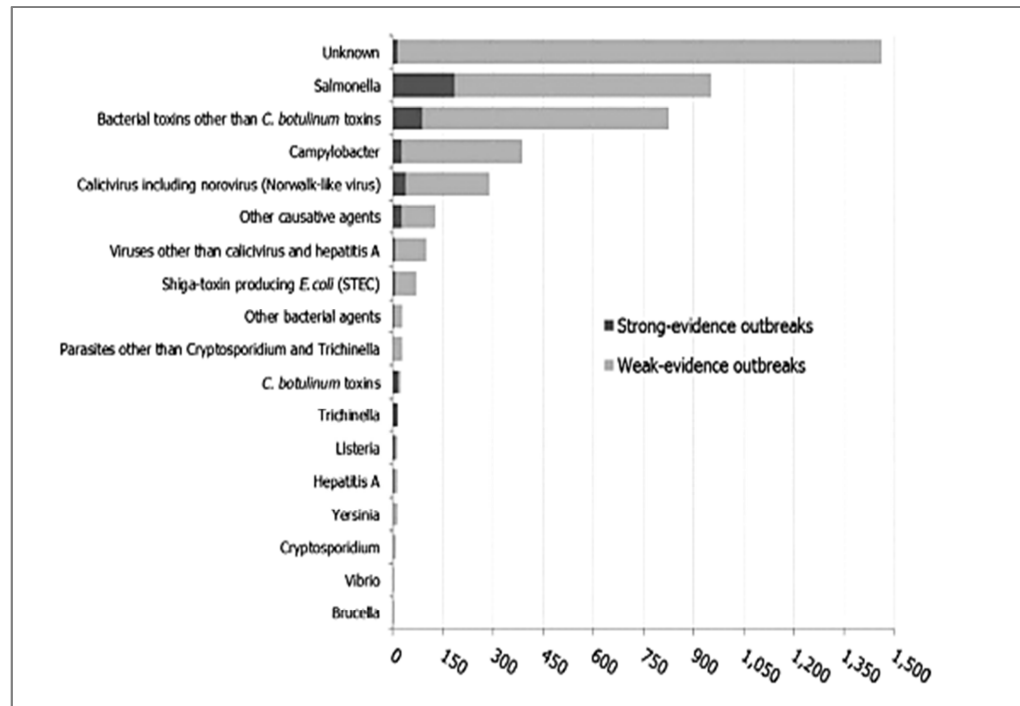


Figura 3b. Distribución por agente causal de toxiinfecciones alimentarias en la UE
(EFSA & ECDC, 2016)

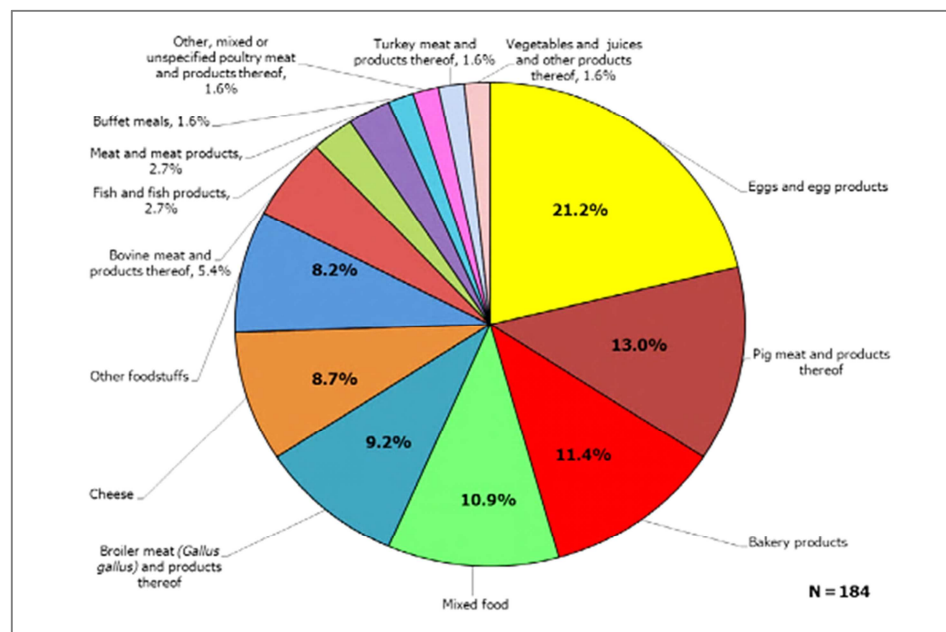


Figura 3c. Origen alimentario en brotes causados por *Salmonella* (EFSA & ECDC, 2016)

La salmonelosis es una de las principales zoonosis que afecta al hombre y a los animales domésticos y salvajes, con especial relevancia en los países de producción intensiva de cerdos, terneros y aves (OIE, 2016).

En la actualidad, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp., son los dos agentes patógenos más importantes responsables de la mayoría de toxiinfecciones alimentarias de origen bacteriano en Europa (EFSA & ECDC, 2016).

Generalmente, en cada país se conocen los serotipos de *Salmonella* que circulan entre la población humana y animal, los cuales son publicados en los boletines epidemiológicos. Entre ellos, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son los serotipos que con más frecuencia se aíslan en el hombre; *S. Typhimurium* se encuentra sobre todo en ganado porcino y vacuno, mientras que *S. Enteritidis* se aísla principalmente de aves, huevos y derivados. En los últimos años se ha observado una disminución importante de los brotes de salmonelosis causados por *S. Enteritidis* gracias a las medidas de control en gallinas ponedoras.

Tampoco debemos olvidar a *Salmonella* Typhi, serotipo específico en humanos y agente causal de la fiebre tifoidea, y que provoca cerca de quinientos mil casos fatales anualmente según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (Pang et al., 1998).

Con el fin de proteger la salud de la comunidad frente a las infecciones por salmonelas transmisibles entre los animales y los seres humanos, el Reglamento 2160/2003/CE, instó a los Estados Miembros a establecer programas nacionales de control para los serotipos de *Salmonella* en aves de corral y cerdos considerados de especial importancia para la salud pública. En este sentido, a pesar de que estos programas han demostrado su eficacia para el control de la salmonelosis en aves de corral, no existe en España un programa de control

definido para el control de la salmonelosis en ganado porcino. De este modo, urge la caracterización de aquellas cepas de *Salmonella* aisladas a lo largo de la cadena alimentaria derivada del cerdo para poder confirmar el riesgo real que suponen para la salud pública.

Con respecto a la situación de *Salmonella* en los animales, es pertinente resaltar que según el informe resumido de 2015 de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para el Control de Enfermedades (ECDC), sobre tendencias y fuentes de zoonosis, si bien el serotipo más frecuente para *G. gallus* fue *S. Infantis*, que representó 1859 o 33,6% de todos los casos reportados, seguido de *S. Enteritidis* (875 aislamientos, 15,8%) y *S. Mbandaka* (373 aislamientos, 6,7%). A nivel de la UE, se produjo un aumento sustancial de aislamientos de *S. Enteritidis* (aproximadamente un 35%) en 2015 (875 aislamientos) en comparación con 2014 (641 aislamientos), así como en *S. Typhimurium* (321 aislamientos en 2015 y 209 en 2014). En cuanto a las gallinas ponedoras, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los dos serotipos reportados más frecuentes, representando el 41,2% y el 11,1% de los aislamientos de esta fuente (EFSA & ECDC, 2015).

Por otro lado, el nivel general de unidades positivas de *Salmonella* en materia de piensos derivados de animales y vegetales en 2015 fue del 5,13% de las 4546 unidades notificadas por 21 EM. En comparación con los años 2014 (3,8%) y 2013 (1,4%), observándose un notable aumento (EFSA & ECDC, 2016).

La salmonelosis se propaga fácilmente y, por consiguiente, es un problema de salud pública mundial. *Salmonella* es uno de los patógenos alimentarios más comúnmente aislados y asociados con los animales de abasto (Pires et al., 2010); así pues, el control de *Salmonella* spp. en la producción animal y la búsqueda de

alternativas de tratamientos como los aceites esenciales, es necesario para la salud pública y animal. La naturaleza persistente, frecuentemente asintomática de la infección por *Salmonella* y la capacidad del organismo para colonizar otras especies animales y sobrevivir en el medio ambiente significa que su control efectivo generalmente requiere múltiples medidas, aumentando la dificultad de su detección y en consecuencia su control.

USO DE ANTIMICROBIANOS Y RESISTENCIAS

Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias que se obtienen por síntesis o naturalmente a partir de los cultivos de microorganismos. Mediante modificaciones de la estructura química de un agente obtenido naturalmente, es posible producir agentes semi-sintéticos (Helke et al., 2017).

Los medicamentos antimicrobianos desempeñan un papel importante en el tratamiento de enfermedades y su uso es fundamental para proteger tanto la salud humana como animal. Sin embargo, las sustancias antimicrobianas suelen utilizarse indebidamente para tratar y prevenir enfermedades en el sector ganadero, acuícola y en la producción agrícola. Estas acciones suelen estar asociadas con el riesgo potencial de aparición y propagación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos (Migliorati, 2017).

Es importante indicar algunas diferencias encontradas en las definiciones establecidas por algunos organismos internacionales de salud pública y sanidad animal (FAO, 2017; OIE, 2017; OMS, 2016) entre antibacteriano, antibiótico, antimicrobiano y clase antimicrobiana, y que a continuación desglosamos:

- ✓ **Antibacteriano:** Un medicamento que mata o inhibe las bacterias.
- ✓ **Antibiótico:** Un agente o sustancia que se produce a partir de microorganismos que pueden actuar contra otro microorganismo vivo. Las sustancias antimicrobianas que son sintéticas, semisintéticas o derivadas de plantas o animales, por lo tanto, por definición estricta, no se consideran antibióticos. Aunque no es completamente técnicamente correcto, para los propósitos de este documento el uso del término "antibiótico" debe ser interpretado como "antibacteriano".
- ✓ **Antimicrobiano:** agente o sustancia derivada de cualquier fuente (microorganismos, plantas, animales, sintéticos o semisintéticos) que actúa contra cualquier tipo de microorganismo: bacterias (antibacterianas), micobacterias (antimicobacterianas), hongos (antifúngicos), parásitos (antiparasitarios) y virus (antivirales). Todos los antibióticos son antimicrobianos, pero no todos los antimicrobianos son antibióticos. Los agentes antimicrobianos son medicamentos que se utilizan para tratar las infecciones, en concreto las que son de origen bacteriano, y resultan fundamentales tanto en salud humana como en sanidad animal, aunque durante los últimos años algunas bacterias han presentado una resistencia parcial o total a varios de ellos.
- ✓ **Clase antimicrobiana:** agentes antimicrobianos con estructuras moleculares relacionadas, a menudo con un modo de acción similar debido a la interacción con un objetivo similar y, por lo tanto, sujetos a mecanismos similares de resistencia. Las variaciones en las

propiedades de los agentes antimicrobianos dentro de una clase a menudo surgen como resultado de la presencia de diferentes sustituciones moleculares, que confieren diversas actividades intrínsecas o diversos patrones de propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

En medicina veterinaria, paralelamente a lo que ocurría en medicina humana, los antibióticos comenzaron a ser utilizados para tratamientos de animales enfermos, y cuando eso era considerado necesario, tratar animales asintomáticos que convivían con los enfermos, es decir tratamientos grupales profilácticos. En esa época, alimentando cerdos con desechos de fermentación de tetraciclinas, se descubrió que esos cerdos crecían más que los que recibían otros alimentos. Al asociarse la respuesta lograda con el origen del alimento, se estaba descubriendo la capacidad de los antibióticos de contribuir al crecimiento de los animales, mejorando los índices de conversión, lo que significa, crecer más con la misma cantidad de alimento. Este fue el inicio histórico del uso de antibióticos como promotores del crecimiento cuando son adicionados en cantidades subterapéuticas a los alimentos. Los grupos de antibióticos que, en general se utilizaban para este fin eran penicilinas y tetraciclinas. Algunos años más tarde, comenzó a surgir preocupación por la aparición de cepas resistentes a estos antibióticos de *Salmonellas* aisladas de terneros con enfermedad respiratoria (Migliorati, 2017).

Como se ha resaltado, el uso de antimicrobianos en veterinaria tiene tanta antigüedad como en medicina humana. Existe un grupo de agentes que se utilizan

como coccidias, pero que a su vez tienen acción antimicrobiana; así como otros antimicrobianos que actúan como desinfectantes y antisépticos.

Los antimicrobianos se dividen generalmente de acuerdo a su origen y composición química en varias familias, no obstante cada agente antimicrobiano tiene características propias con respecto a su acción farmacológica y a su espectro de acción antimicrobiana.

El CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) en 2015 presentó la siguiente clasificación de los agentes antimicrobianos, con sus principales clases y subclases (**Figura 4**).

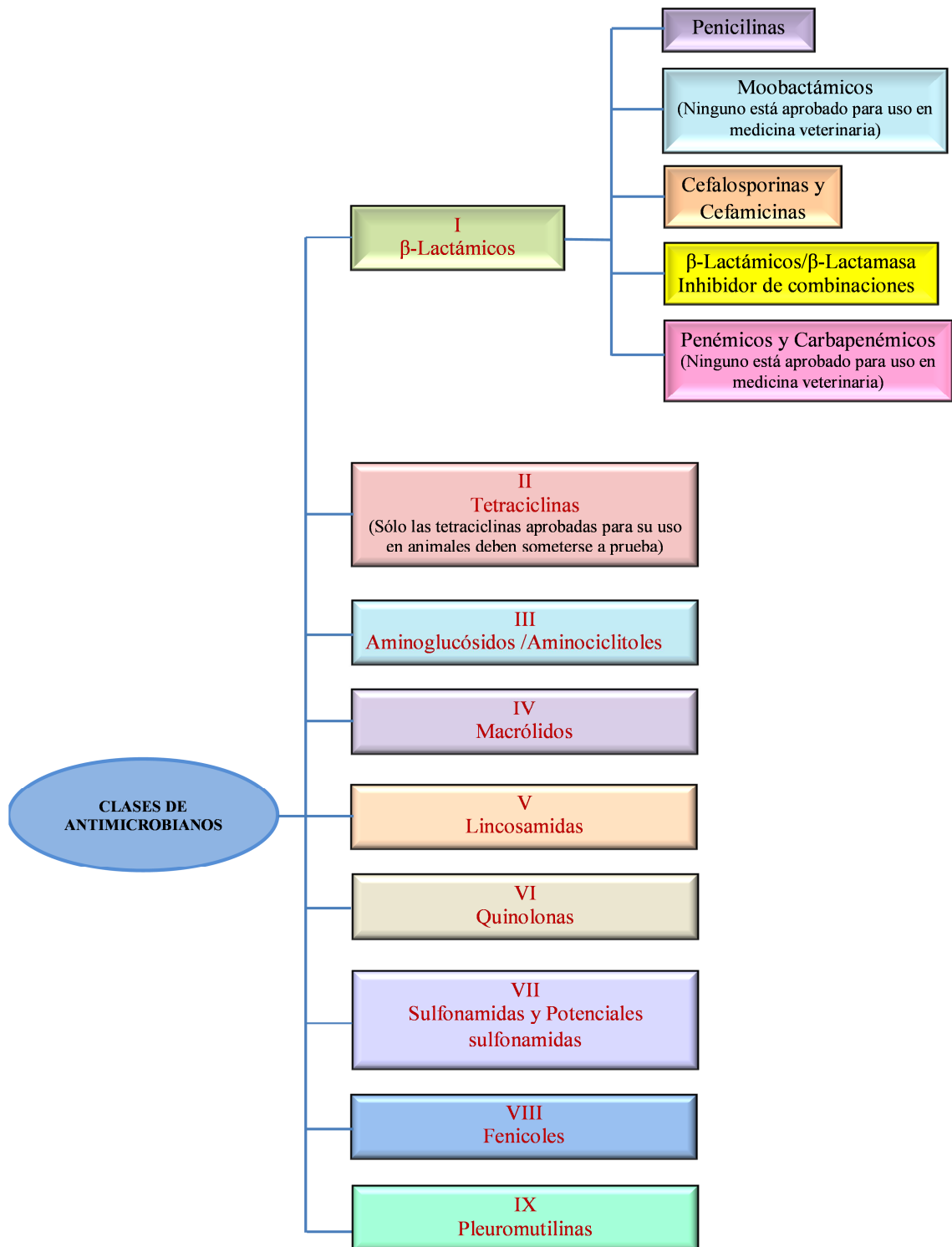


Figura 4. Clasificación de los Antimicrobianos (CLSI, 2015)

Además, los antimicrobianos se pueden dividir en bacteriostáticos y bactericidas, según si inhiben el crecimiento bacteriano o si tienen una acción directa en su eliminación. Esto no implica necesariamente que un grupo sea mejor que el otro.

Existen distintos mecanismos de acción antibiótica, y diferentes mecanismos de resistencia que se ha tratado de resumir en la **Figura 5**.

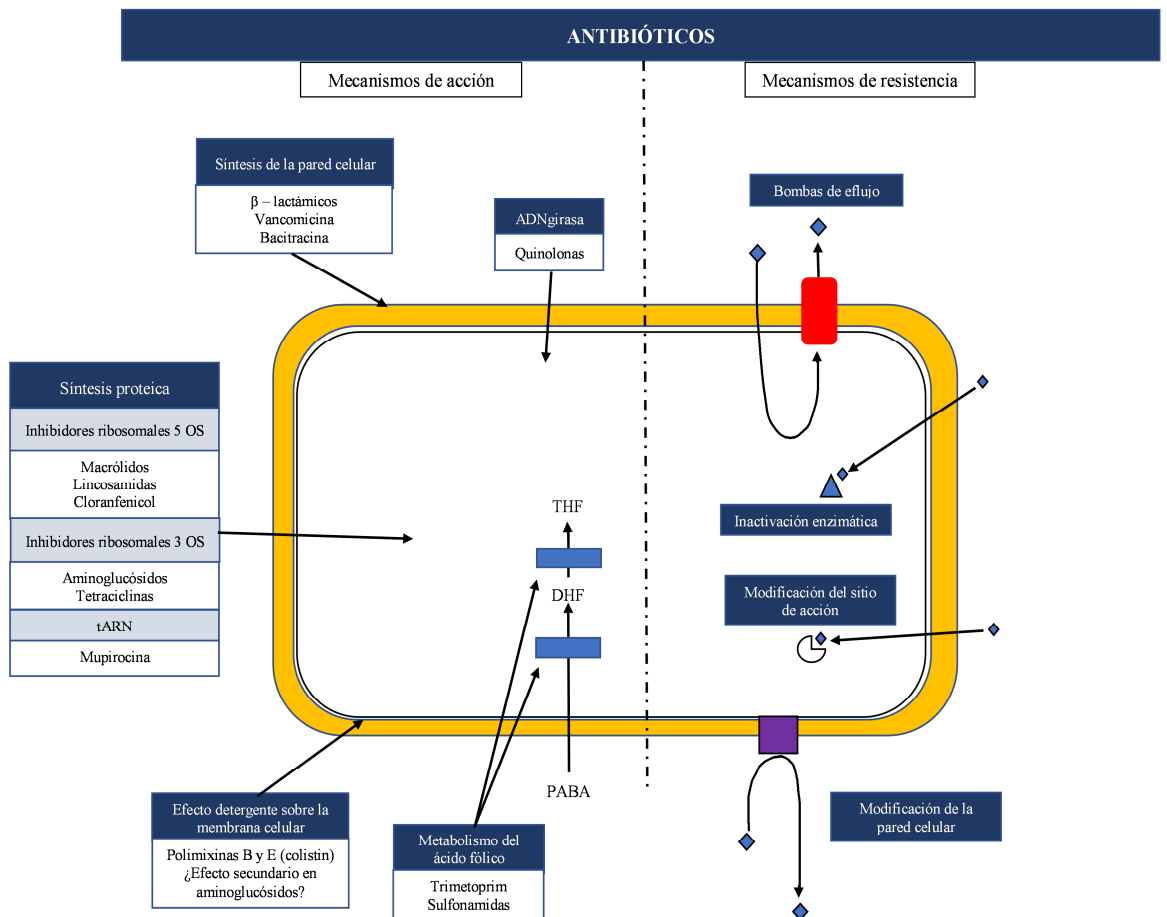


Figura 5. Mecanismos de acción y de resistencia antimicrobiana (Chen et al., 2015)

Resistencia Antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos ocurre cuando los microorganismos (como bacterias, hongos, virus y parásitos) cambian cuando se exponen a fármacos antimicrobianos (como antibióticos, antifúngicos, antivirales, antimaláricos y antihelmínticos). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el hospedador, aumentando el riesgo de propagación a otros. También, la capacidad del microorganismo de multiplicarse o persistir en presencia de un nivel aumentado de un agente antimicrobiano (Köck & Kreienbrock, 2017).

La difusión mundial de la resistencia a los antimicrobianos (AMR) es ahora reconocida como una amenaza de salud pública mundial. Debido a la heterogeneidad geográfica, complejidad y a la constante evolución dinámica de organismos resistentes y genes, la vigilancia es una herramienta clave para la comprensión, medición e información a las acciones en la lucha contra este problema (Núñez-Núñez et al., 2017).

La resistencia a los antimicrobianos supone una amenaza a la esencia misma de la medicina moderna y a la sostenibilidad de una respuesta de salud pública mundial eficaz ante la amenaza persistente de las enfermedades infecciosas. Los antimicrobianos eficaces son imprescindibles para las medidas preventivas y curativas, para proteger a los pacientes frente a enfermedades potencialmente mortales y para garantizar que se puedan llevar a cabo procedimientos complejos, como la cirugía y la quimioterapia, con escasos riesgos. Sin embargo, el mal uso y el abuso sistemático de estos fármacos en la medicina y la producción de alimentos han puesto en riesgo a todas las naciones. Hay pocos productos de recambio en fase de investigación y desarrollo. Sin medidas armonizadas e

inmediatas a escala mundial hacen que se avance hacia una era post-antibiótica en la que infecciones comunes podrían volver a ser mortales (Obaidat et al., 2017).

Cuando los microorganismos se vuelven resistentes a los medicamentos, se reducen las opciones para tratar las enfermedades que las provocan. Esa resistencia a los antimicrobianos ocurre en todas partes del mundo y afecta a una amplia selección de microorganismos, con una creciente prevalencia que amenaza la salud humana y animal. Las consecuencias directas de una infección por microorganismos resistentes pueden ser graves, por ejemplo enfermedades más largas, mayor mortalidad, estancias prolongadas en el hospital, pérdida de protección en el caso de los pacientes que se someten a operaciones y otros procedimientos médicos, e incremento de los costos. La resistencia a los antimicrobianos afecta a todos los ámbitos de la salud, implica a muchos sectores y tiene efectos en el conjunto de la sociedad (OMS, 2016).

Por tanto, se considera que la resistencia a los antimicrobianos, es uno de los problemas de salud pública más apremiantes del mundo. Las infecciones de bacterias transmitidas por los alimentos resistentes a los antibióticos comunes, tales como *Salmonella*, pueden causar resultados de salud más graves que las infecciones con bacterias que no son resistentes a los antibióticos. El uso excesivo o inadecuado de antibióticos en animales, especialmente animales productores de alimentos, puede conducir a la transferencia de resistencia bacteriana a los seres humanos a través de la cadena alimentaria (Lee et al., 2016).

A través de NARMS (Sistema Nacional de Monitoreo de la Resistencia a los Antimicrobianos), los expertos en seguimiento y en estudiar los cambios en la resistencia a antibióticos entre varias bacterias transmitidas comúnmente a través de alimentos, resaltan los hallazgos más importantes de resistencia para

Salmonella, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Enterococcus*. En el informe del año 2013 se destaca a *Salmonella* y *Campylobacter*, como las principales causas bacterianas de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Además, los aislamientos de los casos clínicos humanos confirmados por laboratorio se prueban y se comparan con bacterias derivadas de diversas etapas de la cadena de producción de alimentos (Crump et al., 2011).

La resistencia a un antibiótico en concreto puede ser un hecho natural (de por si el microorganismo es resistente) o adquirido de forma secundaria (aparece tras haber sido inicialmente sensible), pero siempre es un fenómeno que debemos esperar ya que las bacterias buscarán el sistema para defenderse de los efectos de los antibióticos.

La resistencia, por tanto, se puede deber, entre otros aspectos a: (i) la falta de especificidad por el antimicrobiano, (ii) mutaciones esporádicas del agente en un determinado momento, y (iii) adquisición de DNA que codifica resistencia a antimicrobianos. Las características de resistencia y sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas bacterianas es lo que se conoce como fenotipo de resistencias o patrón de resistencias. Es así como, para que se desarrolle la resistencia, son necesarias dos condiciones: el contacto persistente del microorganismo con el agente antimicrobiano, y que el contacto debe darse con una concentración de antimicrobiano que permita la supervivencia del microorganismo (Blondeau, 2009; Scheld, 2003).

El incremento de *Salmonella enterica* multirresistente a los antibióticos, incluidos β -lactámicos y fluoroquinolonas, es un problema de importancia clínica. La propagación de *Salmonella* Typhimurium resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas, tetraciclina; portadoras de la isla

genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1) y la captación de material genético transferible ha favorecido la multirresistencia en este género (De Toro et al., 2014).

Para enfatizar la importancia que implica el estudio de resistencias bacterianas, principalmente de *Salmonella*, es pertinente mencionar que en la última convención de Ginebra (2017) la OMS (WHO por sus siglas en ingles), publica su primera lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, entre las cuales se encuentra la familia *Salmonellae* (resistentes a fluoroquinolonas), dentro del nivel de prioridad 2 (elevada). La lista se ha elaborado para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antimicrobianos, como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos como problema de salud pública. A continuación presentamos un esquema sobre la clasificación de las familias que representan priorización (**Figura 6**).

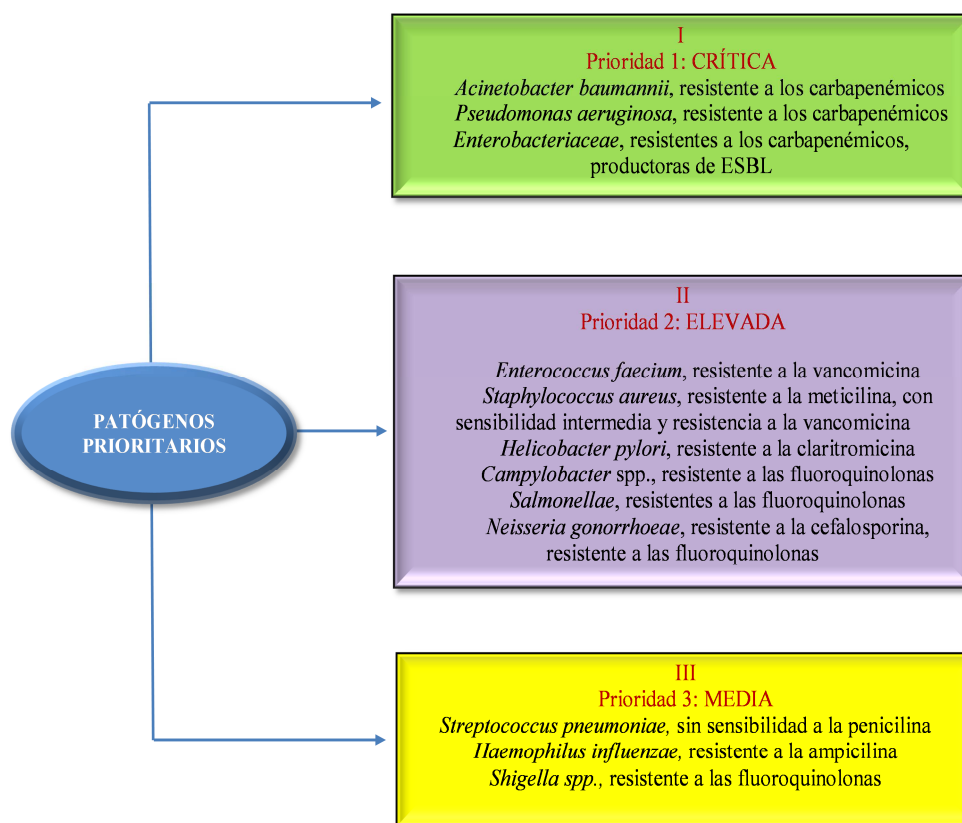


Figura 6. Patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos (WHO, 2017)

Como se ha mencionado, las organizaciones internacionales de salud y seguridad alimentaria han alertado desde hace años del uso inapropiado de los antimicrobianos en las granjas animales, así como del importante papel epidemiológico de emergencia y diseminación de cepas resistentes con alto impacto en la salud pública e industria alimentaria (FDA, 2013; OIE, 2016). Los últimos documentos publicados por la EFSA y el ECDC sobre resistencia antimicrobiana en bacterias zoonóticas, señalan la amplia difusión de cepas multirresistentes (MDR, del inglés Multiple Drug Resistance) de *Salmonella* spp. detectadas con altos niveles de resistencia frente a enrofloxacin, ceftiofur y trimetoprim-sulfametoxazole (EFSA & ECDC, 2015).

Por todo ello, se ha hecho imprescindible establecer medidas de vigilancia epidemiológica para detectar el desarrollo de resistencias antibacterianas. Astorga

et al. (2007), detectaron en el sur de España y en cerdos de cría intensiva (121 granjas analizadas) prevalencias del 33%, siendo Rissen, Derby y Typhimurium los serotipos más frecuentes, y DT104 el fagotipo más prevalente en cepas ST. Los niveles de multirresistencia fueron del 64%, con elevados porcentajes de resistencia frente a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclinas (R-ASSuT). Por su parte, Gómez-Laguna et al. (2011), detectan en cerdo Ibérico una prevalencia de infección por *Salmonella* spp. en las granjas muestreadas (67 granjas/804 animales) idéntica a la observada previamente en sistemas intensivos en la misma zona geográfica; además, se detectaron serotipos poco comunes de origen silvestre (por ej: Mikawasima, Hessarek) y una mayor diversidad de fagotipos. En este caso, el 58% de las cepas mostró resistencia frente a 1 ó más antimicrobianos siendo los niveles de cepas MDR inferiores a los encontrados en cerdo blanco (36% vs 64%).

La resistencia antimicrobiana de *Salmonella* puede deberse a varios determinantes localizados en el cromosoma bacteriano o en plásmidos (Folley & Lynne, 2008; Switt et al., 2009). Estos determinantes genéticos pueden ser responsables de la expresión de mecanismos de resistencia intrínsecos relacionados con la producción de beta-lactamasas, modificación de la composición antimicrobiana por enzimas bacterianas, variaciones de la permeabilidad bacteriana, presencia de bombas de flujo (efflux pumps), o modificaciones de receptores diana (Folley & Lynne, 2008).

La resistencia antimicrobiana puede producirse también a través de la expresión de mecanismos de resistencia adquirida, que emergen por medio de mutaciones puntuales en genes cromosomiales, o a través de la adquisición de elementos móviles tales como plásmidos, transposones o islas genómicas (Switt et

al., 2009). La transferencia de resistencia se puede producir directamente de la misma o de diferentes especies o géneros de bacterias, o indirectamente a través del medio ambiente (EFSA, 2010; Folley & Lynne, 2008). La microbiota intestinal de los seres humanos y animales está expuesta a menudo a compuestos antimicrobianos de diferentes clases, concentraciones y frecuencias de exposición, utilizados para la terapia, la profilaxis o metafilaxis. Esta exposición puede derivar de los piensos o del entorno (Martins da Costa et al., 2007).

La aparición, selección y diseminación de bacterias resistentes a los antimicrobianos se siguen atribuyendo principalmente a la presión selectiva del mal uso y abuso de antibióticos (Sayah et al., 2005), de este modo las bacterias intestinales pueden volverse resistentes a algunos compuestos antimicrobianos y por lo tanto transmitir esta resistencia a *Salmonella*, que ocupa el mismo nicho ecológico.

La caracterización de los factores de virulencia de microorganismos zoonóticos, incluyendo la presencia de genes de resistencia a los antimicrobianos, es de gran importancia para asegurar la protección y promoción de la salud en el concepto más amplio de “*un mundo, una salud*”. Por todo ello, la difusión de bacterias resistentes a los antimicrobianos es una amenaza ampliamente reconocida para la salud pública y la sanidad animal.

Todas estas causas han llevado a la industria farmacéutica a buscar nuevos antimicrobianos, si bien la variabilidad química resulta insuficiente para prevenir el aumento de las resistencias (Schwarz et al., 2017). Como consecuencia existe actualmente un interés creciente en el uso de compuestos de origen natural con propiedades antimicrobianas, inmunoestimulantes o probióticas, como lo son los aceites esenciales. Es así como, la búsqueda de nuevos métodos de control frente a

estos microorganismos, es un objetivo prioritario de numerosos grupos de investigación. En este sentido, nuestro grupo ha investigado *in vitro* la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, sus efectos sinérgicos con ciertos antimicrobianos (enrofloxacin, ceftiofur y trimetoprim sulfametoxazol,) sobre cepas MDR de *Salmonella entérica* (Solarte et al., 2017) y la posibilidad de que se generen mutaciones genéticas.

Para complementar la información sobre los mecanismos de resistencia antimicrobiana, en la **Tabla 1** se presentan los mecanismos de acción y de resistencia de los antimicrobianos ensayados en nuestro estudio.

Tabla 1. Mecanismos de acción y resistencia de los antimicrobianos ensayados

Antimicrobiano	Mecanismo de Acción	Mecanismos de resistencia
Enrofloxacin	Inhibidores de la síntesis de ADN con objetivo primario topoisomerasa II y IV	Precusores de peptidoglicano modificados (afinidad de unión baja)
Ceftiofur	Inhibidores de la síntesis de la pared celular con sitios de unión a penicilina como objetivo principal	Beta-lactamasas, proteínas de unión a penicilina alteradas
Trimethoprim-sulfamethoxazole	Inhibidores de la síntesis de ácido fólico	Barrera de permeabilidad y / o bombas de eflujo; Enzimas diana naturalmente insensibles; Cambios regulatorios en las enzimas diana; Cambios mutacionales en enzimas diana; Resistencia adquirida por enzimas diana resistentes a fármacos

Fuente: Langeveld et al., 2014.

ESTUDIO DE NUEVOS ANTIMICROBIANOS PARA USO EN VETERINARIA

El descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos comienza con la búsqueda de moléculas con el potencial terapéutico adecuado que presenten los mínimos efectos adversos. Actualmente, la mayor parte de los fármacos se crean por:

- ✓ Modificación química de una molécula conocida.
- ✓ Investigaciones aleatorias basadas en la actividad de plantas o moléculas orgánicas ya descubiertas, o con posibilidades terapéuticas.
- ✓ Diseño racional de fármacos a partir del conocimiento existente sobre medicamentos biológicos y estructuras químicas.
- ✓ Utilización de la biotecnología y clonación genética.

Este proceso suele ser largo, y durante el mismo son muchas las sustancias estudiadas que finalmente no alcanzan la categoría de fármaco (García et al., 2000; Martínez et al., 2013). Una vez seleccionada la sustancia, su estudio incluirá las siguientes fases (Cantón et al., 2013):

A. Caracterización físico-química: consiste en determinar las propiedades físicas del fármaco (punto de ebullición, comportamiento termodinámico, evaporación, solubilidad, etc.). La caracterización química describe aspectos como la estructura química (ácidos, alcoholes, éteres, etc.), comportamiento iónico, especificaciones iniciales, impurezas presentes, etc.

B. Caracterización farmacológica: consiste en investigar y verificar la actividad farmacológica del medicamento mediante estudios *in vitro*, en cultivos celulares y animales de experimentación. Se suelen iniciar asimismo los estudios de farmacodinamia (PD), farmacocinética (PK) y toxicidad.

En el caso de los antimicrobianos, esta parte incluye *los estudios de susceptibilidad in vitro* para determinar:

- ✓ **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).** Es posiblemente la medida más utilizada para estudiar la susceptibilidad bacteriana y/o potencial de un antimicrobiano. Se define como la menor concentración de antimicrobiano que previene el crecimiento visible del inóculo bacteriano tras 16-20 horas de incubación (García et al., 2000; Grau et al., 2005).
- ✓ **CMI₅₀ y CMI₉₀.** Se establecen a partir de estudios de distribución de la susceptibilidad en la población bacteriana y se definen como la menor concentración de producto capaz de inhibir el crecimiento del 50% y del 90% de las cepas estudiadas (CLSI, 2009; FAO, 2004; MacGowan & Wise, 2001). La CMI₉₀ se toma como referencia para determinar, junto a los modelos de PK/PD, los puntos de corte de sensibilidad/resistencia. Actualmente, este valor sirve además, como guía para establecer la concentración de AMB que es preciso alcanzar en el lugar de la infección (Becerril et al., 2012; Grau et al., 2005; Griffin et al., 2000).
- ✓ **Concentración Mínima Bactericida (CMB).** Definida como la menor concentración de antimicrobiano que reduce en un 99,9% el inóculo inicial de células viables después de una incubación de 16-20 horas en caldo de cultivo (Grau et al., 2005; Rodríguez et al., 2012).
- ✓ **Concentración de Prevención de Mutantes (MPC).** Es una nueva medida *in vitro* de la susceptibilidad antimicrobiana definida como la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento tanto de las cepas susceptibles como de las cepas resistentes por mutaciones de primer paso, que estarían presentes en infecciones con alta

carga bacteriana (inóculo bacteriano: $\geq 10^9$ UFC) (Balaje et al., 2013; Dahiya et al., 2014; Nordqvist et al., 2016).

- ✓ **Ventana de selección de mutantes (VSM).** Comprende el intervalo de concentraciones entre la CMI y la MPC, a las cuales se inhibiría el crecimiento de las subpoblaciones sensibles y se favorecería el crecimiento selectivo de las cepas mutantes resistentes (Drlica, 2003) (**Figura 7**).

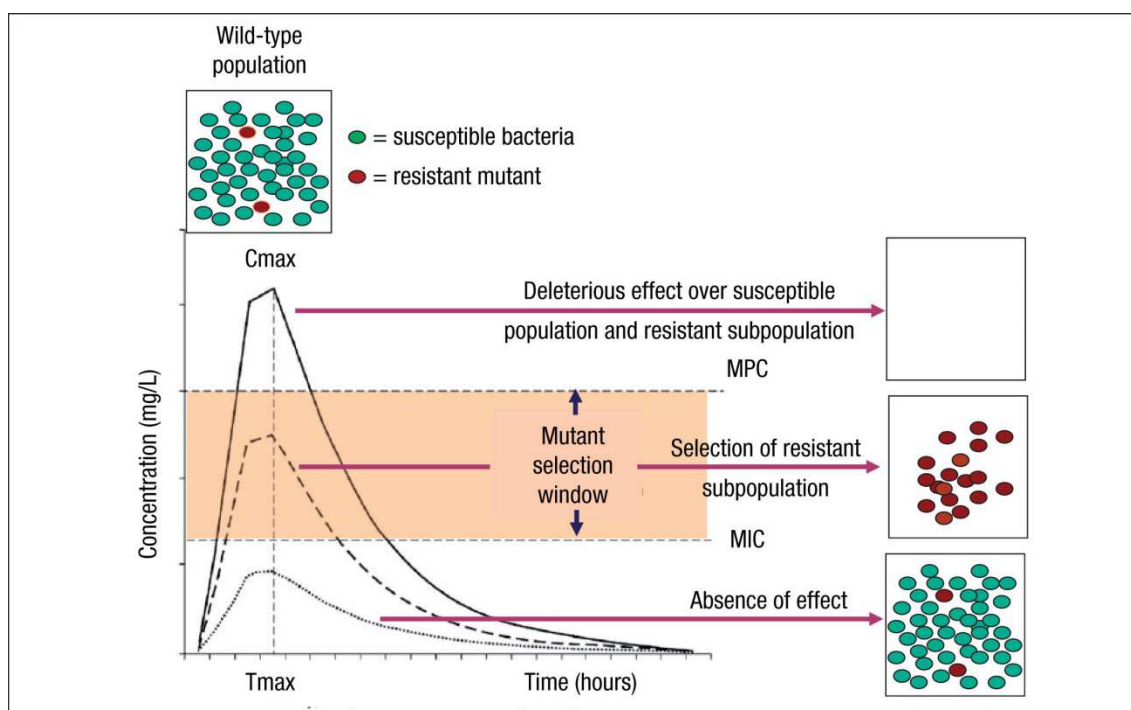


Figura 7. Concepto de ventana de selección de mutantes (Cantón et al., 2013)

- ✓ **Potencial Microcida.** Determinado en base al índice CMB/CMI, permite caracterizar a los antimicrobianos como bactericidas (índice < 4) o bacteriostático (índice ≥ 4) (Montravers & Dupont, 1996). Es de suponer que las sustancias bactericidas presentarán una CMI y CMB muy similares, si bien con algunos microorganismos la diferencia es significativa justificando el estudio de la CMB, especialmente en animales

inmunodeprimidos cuya capacidad para eliminar el microorganismo esta disminuida (Martínez et al., 2013; Silveira et al., 2005).

- ✓ **Curva de Letalidad.** Es un método cinético de determinación del poder bactericida. Se valora la capacidad de destruir en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. En este sentido es complementario de la CMB (García et al., 2000).
- ✓ **Estudio del efecto sinérgico en combinación con otras sustancias con propiedades antimicrobianas** (antibióticos, ácidos orgánicos, péptidos, excipientes, etc.). Se realizan estudios *in vitro* para valorar un posible efecto sinérgico que permita expandir el espectro de acción, minimizar la toxicidad de los fármacos, disminuir la aparición de resistencias bacterianas, controlar infecciones múltiples y/o causadas por microorganismos multirresistentes (Miladi et al., 2017)

Los métodos estandarizados para el estudio de la actividad de un antimicrobiano frente a bacterias patógenas de origen animal son:

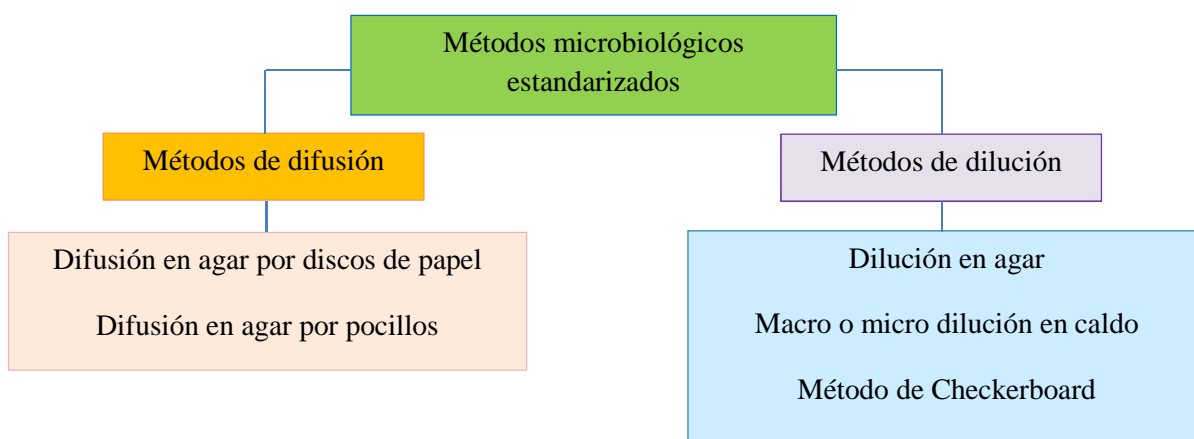


Figura 8. Métodos estandarizados de la actividad antimicrobiana de un fármaco (CLSI, 2015)

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida (García et al., 2000). Además del estudio de susceptibilidad, la caracterización farmacológica del nuevo antimicrobiano incluirá:

- ✓ **Efecto post-antibiótico (EPA).** Se refiere al tiempo que se requiere para que un patógeno recupere el crecimiento normal después de la exposición al agente antimicrobiano (Canut-Blasco et al., 2016).
- ✓ **Mecanismos de acción.**
- ✓ **Mecanismos de resistencia bacteriana.**

C. Pre-formulación: Diseño de la composición y forma de aplicación del fármaco que le confieren mayor estabilidad, seguridad y eficacia (Blasco et al., 2015).

D. Ensayos clínicos *in vivo*: su objetivo es determinar la actividad biológica, toxicidad, efectos adversos, farmacocinética (absorción, bio-disponibilidad, distribución, metabolismo y excreción), farmacodinámica (efectos sobre el organismo), relación dosis-respuesta en animales sanos y animales enfermos (Idoate & Idoipe, 2002).



Figura 9. Esquema fases ensayos *in vivo*

ACEITES ESENCIALES

GENERALIDADES

El uso de los aceites esenciales (AE) en sanidad animal para el control de *Salmonella* es el principal objeto de nuestra investigación, en este sentido es pertinente realizar una recopilación de conceptos y definiciones, que resultan importantes al momento de tratar de explicar el complejo mecanismo de acción, composición y principales efectos de los AE ensayados.

Los AE son una mezcla de sustancias químicas biosintetizadas por las plantas aromáticas como parte de su metabolismo secundario que se extraen por destilación en corriente de vapor o por expresión del material vegetal. Se trata de productos muy volátiles, ligeros, no grasos, poco solubles en agua y solubles en alcohol, grasas y aceites vegetales (Mith et al., 2014).

Los AE pueden obtenerse de sus diferentes partes, tales como flores, hojas, semillas, corteza, frutos y raíces (Burt, 2004); se consideran metabolitos secundarios o compuestos orgánicos que no están directamente implicados en el crecimiento, desarrollo o reproducción normal de la planta, sino que suelen estar involucrados en su defensa y por lo tanto pueden poseer propiedades antimicrobianas (Tajkarimi et al., 2010).

El efecto positivo de los AE está principalmente ligado a los componentes de la planta de donde se extraen, incluyendo los terpenoides (mono y sesquiterpenos, esteroides), fenólicos (taninos), glucósidos, alcaloides (presentes en forma de alcoholes, alquides, cetonas, ésteres, éteres y lactonas), flavonoides y glucosinolato (Wenk, 2006). La mayoría de estos compuestos se encuentran en

trazas, si bien algunos estudios demuestran que el papel de estas sustancias en la actividad antimicrobiana es fundamental, debido posiblemente a un efecto sinérgico, de forma que el aceite entero tiene mayor actividad que sus componentes mayoritarios (Gill et al., 2002; Lahlou, 2004; Mourey & Canillac, 2002).

Los AE tienen una larga historia de uso para fines médicos, perfumes y cosméticos, y como hierbas y especias para alimentos (O'Bryan et al., 2015). Los AE y sus extractos, continúan en uso por la medicina popular, aunque actualmente la industria farmacéutica y cosmética, ha aumentado el interés por estos compuestos, debido al relativo estatus de seguridad y a la amplia aceptación por la población (Salvia-Trujillo et al., 2015), dado por sus diversas propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Buranasuksombat et al., 2011).

Con la prohibición por la UE a partir del 1 de enero de 2006 de los antibióticos como promotores del crecimiento (AGP) en piensos (Reglamento 1831/2003/CE), se han venido evaluando métodos alternativos para mejorar el rendimiento del animales de abasto público, especialmente en la producción porcina y avícola (Windisch et al., 2008).

La mayoría de los AE son considerados productos GRAS (generalmente reconocidos como agentes seguros) por la FDA y ello les hace buenos candidatos para su uso como aditivos (Díaz-Sánchez et al., 2015). Actualmente, los AE están autorizados para su utilización en alimentación humana y animal como aditivos alimentarios. Como consecuencia de ello, no existe un protocolo estandarizado ni puntos de corte establecidos para determinar su actividad *in vivo* y el carácter sensible o resistente de los microorganismos (Silva et al., 2013).

Por otra parte, a pesar de las mejoras modernas en las técnicas de producción y preservación de alimentos, la inocuidad alimentaria es un problema creciente de salud pública (Lv et al., 2011; OMS, 2016). La carne cruda y poco cocinada, especialmente de origen porcino y/o aves de corral, así como los huevos contaminados son los vehículos más comúnmente implicados en la infección por *Salmonella* spp.; junto con su difusión y persistencia, también el aumento de la resistencia a los antibióticos de esta especie es una cuestión crucial (Adzitey et al., 2012), lo que causa problemas en la selección de las terapias farmacológicas adecuadas.

Por lo tanto, las fuentes alternativas de compuestos antimicrobianos seguros, efectivos y posiblemente naturales se han convertido en un área estratégica de investigación, tanto en el campo médico, como en los de la industria alimentaria (Mazzarrino et al., 2015). En este contexto, existe un creciente interés entre los científicos debido a perspectivas concretas de aplicaciones industriales de AE como agentes antimicrobianos y biopreservadores.

Notablemente, la actividad antimicrobiana de los AE y sus mecanismos de acción se está indagando cada vez más en la literatura científica, sin embargo, hay una brecha de investigación sobre la cinética de inactivación o la dinámica de crecimiento de supervivencia de bacterias expuestas a AE (De Oliveira et al., 2013).

La mayoría de estos productos se utilizan en sanidad animal como suplementos alimentarios, y su aprobación como productos terapéuticos precisa de estudios que demuestren su eficacia como antimicrobianos, su efecto sobre la producción animal y su seguridad para la salud humana y medio ambiental.

En este sentido, las propiedades antimicrobianas de los AE son un enfoque reciente para las aplicaciones agrícolas y pecuarias debido a la intención de muchos consumidores de reducir el uso de "productos químicos peligrosos o no naturales" en sus alimentos (Williams et al., 2004). Por dichas razones, la aplicación de AE como compuestos antibacterianos para animales de abasto o como conservantes de alimentos requiere un conocimiento detallado de sus propiedades, incluyendo el modo de acción (O'Bryan et al., 2015).

COMPOSICIÓN QUÍMICA

Como hemos mencionado, un AE está compuesto por gran variedad de sustancias químicas distintas. Generalmente, aunque hay excepciones, los componentes mayoritarios son hidrocarburos terpénicos (sin aroma o con poca distribución de aroma global) y los minoritarios (pero no por ello menos importantes), son los responsables del aroma característico del aceite esencial (Jakhetia et al., 2010), y se agrupan en distintas familias químicas.

El contenido total en AE de una planta es en general bajo (inferior al 1%), aunque mediante extracción se obtiene en una forma muy concentrada que se emplea en los diversos usos industriales. Al ser mezclas muy complejas de sustancias químicas, su proporción varía de un aceite a otro, ésta variación en la composición, incluso dentro de la misma especie se conoce como quimiotipo (Bakkali et al., 2008).

Un quimiotipo es una entidad químicamente distinta, que se diferencia en los metabolitos secundarios. Existen pequeñas variaciones (ambientales, geográficas, genéticas, etc.) que producen poco o ningún efecto a nivel morfológico, y que sin embargo producen grandes cambios a nivel de fenotipo

químico. Un caso típico es el del tomillo vulgar o común (*Thymus vulgaris*), que tiene 6 quimiotipos distintos según cuál sea el componente mayoritario de su esencia (timol, carvacrol, linalol, geraniol, tujanol-4 o terpineol). Cuando esto ocurre, se nombra la planta con el nombre de la especie seguido del componente más característico del quimiotipo, por ejemplo, *Thymus vulgaris linalol* ó *Thymus vulgaris timol* (Langeveld et al., 2014).

Los AE completos tienden a modificar en su composición exacta debido a factores como la variación estacional, el clima, las subespecies e incluso el método de extracción del aceite (Santoyo et al., 2006). Esto tiene consecuencias para su aplicación y su actividad antibacteriana. La complejidad en su composición también dificulta una comprensión completa del mecanismo exacto de la acción antibacteriana de los AE, ya que todas las interacciones entre componentes separados deben tenerse en cuenta (Bassole & Juliani, 2012; Van-Vuuren & Viljoen, 2011).

Dos de los AE más estudiados son el orégano (*Origanum vulgare*) y el tomillo (*Thymus vulgaris*). Ambos se componen principalmente de carvacrol, timol, γ -terpineno y β -cimeno (Burt, 2004; Burt et al., 2005). Los componentes más importantes del AE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), son el ácido cinámico y el trans-cinamaldehído (Woehrlin et al., 2010) y el componente antimicrobiano más importante del AE de clavo de olor (*Syzygium aromaticum* o *Eugenia aromaticum*) es el Eugenol (Moon et al., 2011).

Los componentes incluyen dos grupos de origen biosintético distinto (Pichersky et al., 2006). El grupo principal se compone de terpenos y terpenoides, y el otro de constituyentes aromáticos y alifáticos, todos ellos caracterizados por un bajo peso molecular (**Figura 10**).

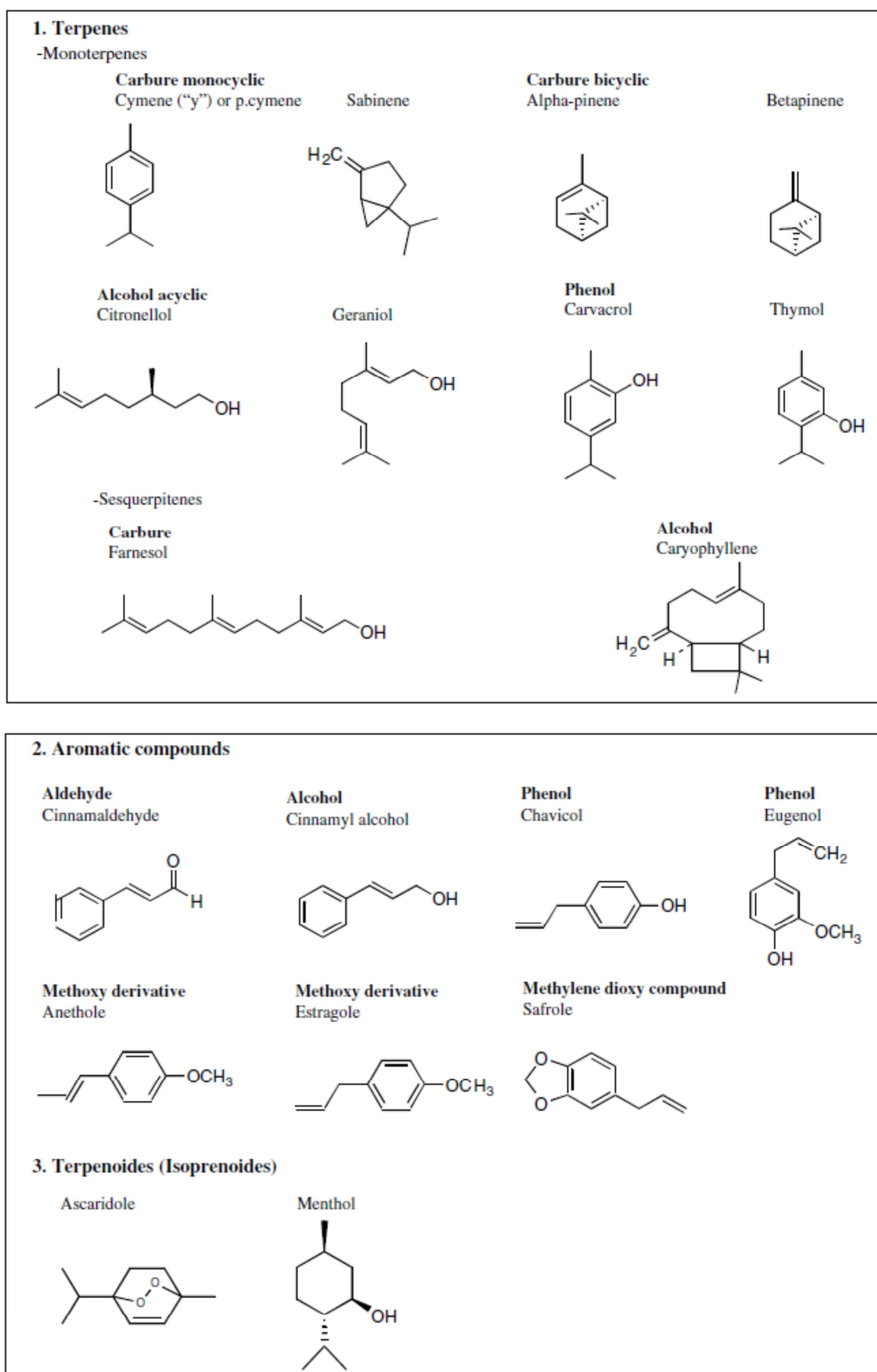


Figura 10. Principales grupos de componentes de los aceites esenciales (Bakkali et al., 2008)

Los terpenos forman una clase estructural y funcionalmente diferente. Están hechos de combinaciones de varias unidades de 5 carbon-base (C5) llamadas isopreno. La biosíntesis de los terpenos consiste en la síntesis del precursor de isopentenil difosfato (IPP), la adición repetitiva de IPPs para formar el precyldifosfato precursor de las diversas clases de terpenos, la modificación del prenildifosfato alílico mediante sintetisas terpénicas específicas para formar el esqueleto terpénico y finalmente, modificación enzimática secundaria (reacción redox) del esqueleto para atribuir propiedades funcionales a los diferentes terpenos. Los terpenos principales son los monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), pero también existen hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40) (Bakkali et al., 2008).

Un terpeno que contiene oxígeno se llama terpenoide. Los monoterpenos se forman a partir del acoplamiento de dos unidades de isopreno, y son las moléculas más representativas que constituyen el 90% de los AE y permiten una gran variedad de estructuras (Shaaban et al., 2012).

Varios de los AE ensayados en la presente tesis doctoral están formados por terpenos, como:

- ✓ Linalool, que contiene un grupo alcohol en su estructura y que está presente en los aceites de canela, tomillo rojo y tomillo común.
- ✓ *p*-Cimeno, presente en aceite de tomillo rojo.
- ✓ β -Cariofileno, constituyente activo del aceite esencial de clavo.
- ✓ Timol y Carvacrol, terpenos fenólicos compuestos principales de los aceites de orégano.
- ✓ Timol, principal activo de los aceites de tomillo rojo y común.

- ✓ Geraniol, un terpeno con grupo alcohol componente del aceite de tomillo común.
- ✓ γ -Terpineno, isómeros de hidrocarburos pertenecientes a los terpenos componentes de los AE de tomillo rojo y orégano.
- ✓ *d-l* Limoneno, terpeno hidrocarburo constituyente activo del aceite de tomillo común.

Por su parte, los compuestos aromáticos, el otro grupo de los principales constituyentes de los AE, son derivados del fenilpropano, aunque aparecen con menor frecuencia que los terpenos. Las vías biosintéticas relativas a los terpenos y los derivados del fenilpropano generalmente se separan en las plantas pero pueden coexistir en algunas, con una vía principal de absorción, como es el caso del AE de clavo, donde el cinamaldehído es el constituyente mayoritario y el eugenol aparece como minoritario (Bakkali et al., 2008).

Las principales fuentes vegetales de los compuestos aromáticos son el anís, la canela, el clavo, el hinojo, la nuez moscada, el perejil, el safrán, el anís estrellado, el estragón y algunas familias botánicas (*Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*). Los componentes nitrogenados o sulfurados tales como glucosinolatos o derivados de isotiocianato (ajo y aceite de mostaza) también son característicos como metabolitos secundarios de diversas plantas o de productos torrefactos, asados o tostados (Moon et al., 2011).

Asimismo, algunos AE ensayados también se encuentran formados por compuestos aromáticos como:

- ✓ Cinamaldehído, compuesto orgánico perteneciente al grupo de los aldehídos y principal activo del AE de canela.

- ✓ Eugenol, compuesto aromático perteneciente a los fenoles, principal componente del AE de clavo, aunque también está presente en el AE de canela.
- ✓ Eugenil Acetato, hace parte del grupo de los fenoles y se encuentra como componente del AE de clavo (**Figura 11**).

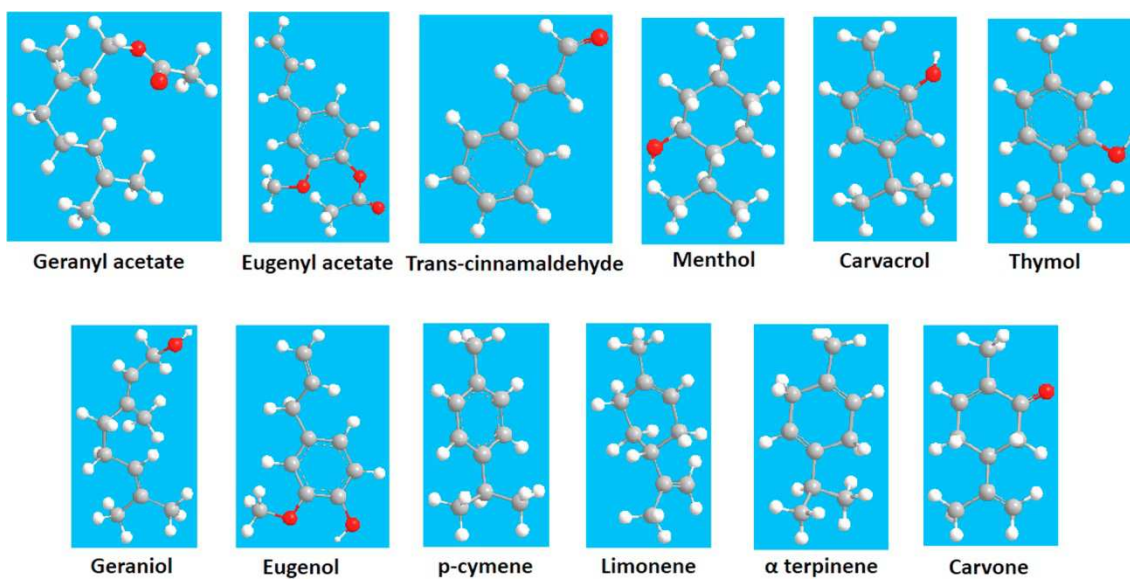


Figura 11. Estructuras químicas de los principales componentes de los aceites esenciales ensayados en este estudio (Shaaban et al., 2012)

Teniendo en cuenta la diversa y compleja composición de los AE, resultaría evidente que el espectro de su acción refleje el potencial de sus compuestos. Sin embargo, este concepto también requiere precaución a la hora de realizar estudios sobre la actividad antimicrobiana de los AE, debido a que muchos de ellos describen los efectos en un número muy limitado de cepas bacterianas. Así, con el fin de aplicar realmente estos compuestos como terapéuticos o como conservantes de alimentos, especialmente cuando se usan en combinación con otros compuestos

basados en acción sinérgica, se deben probar contra un mayor número de cepas para determinar la utilidad de estos compuestos.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Desde hace aproximadamente dos décadas se han ido incrementado las investigaciones sobre las propiedades antimicrobianas de los AE. La mayoría de éstos estudios se basan en la determinación de la CMI, en menor medida la CMB y la curva de letalidad.

Sin embargo, y a diferencia de los antibióticos, no existe un protocolo estandarizado para el estudio *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los AE, que permita comparar los resultados, establecer puntos de corte entre sensibilidad y resistencia y determinar la dosis adecuada de prescripción (Peinado-Guevara et al., 2012; Ross et al., 2001).

En general, la mayoría de autores toman como referencia para el estudio de los AE los métodos estandarizados por el CLSI, para el desarrollo de pruebas con bacterias de origen animal. Los métodos seguidos para cuantificar la actividad de los AE suelen ser la difusión por disco o la dilución en caldo; no obstante, se han encontrado diferencias en el volumen de AE utilizado, la concentración final del inóculo y la adición al diluyente de sustancias emulsionantes (Fratini et al., 2014; Huerta et al., 2016; Silva et al., 2013). Así mismo, la reproducibilidad de los métodos de dilución es sólo adecuada (*Kappa* 0,61-0,78), debido probablemente a la dificultad para diluir los aceites en el caldo (Gutiérrez, 2006), por lo que habitualmente en cada prueba se realizan dos o más ensayos.

Diversos estudios coinciden en destacar el potencial de los AE para el control de microorganismos implicados en toxiinfecciones alimentarias como

Salmonella spp., si bien la cantidad de cepas ensayadas es en muchos casos reducido y se han observado variaciones en la CMI entre aislamientos y serotipos (Huerta et al., 2004; Martínez et al., 2015; Peñalver et al., 2005; Solarte, 2016).

Si bien los compuestos mayoritarios de los AE pueden constituir hasta un 85% del total, debido al efecto sinérgico de los componentes presentes en trazas el AE en su totalidad tiene mayor actividad que sus principales principios activos (Bauer et al., 2001; Burt, 2004). De igual modo, debido a su complejidad química es muy probable que el efecto antimicrobiano sea debido a la acción combinada de varios mecanismos sobre distintas localizaciones de la célula (Ait-Said et al., 2015; Rota et al., 2004).

EFEECTO COMBINADO ENTRE AE Y AMB

Los trabajos desarrollados han demostrado, en general, una notable sensibilidad a los AE, así como una reducción considerable de las dosis de algunos antimicrobianos si se usan combinados con AE (Becerril et al., 2012; Yap et al., 2014).

Los estudios *in vitro* sobre una posible potenciación entre AE y AMB han mostrado resultados muy diversos en función de la especie bacteriana y los productos utilizados. Sin embargo, no se ha comprobado su eficacia y seguridad en ensayos *in vivo* (Randall et al., 2016). En el caso de *Salmonella* spp., las investigaciones han demostrado un aumento en la susceptibilidad de las cepas resistentes a los AMB tras la exposición a dosis subterapéuticas de cinamaldehído, timol y carvacrol, y una reducción de la CMI de los AMB cuando se usan en combinación con carvacrol y timol (Kollanoor-Johny et al., 2010).

Las primeras investigaciones de nuestro grupo de investigación sobre el efecto combinado han demostrado una potenciación de la actividad de la enrofloxacin, ceftiofur y trimetoprim-sulfametoxazol frente a *Salmonella enterica* al combinarlos con los AE principalmente de canela y orégano (Solarte et al., 2017).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los AE contienen una amplia variedad de metabolitos secundarios que son capaces de inhibir o retardar el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos. Los AE y sus componentes tienen actividad contra una variedad de objetivos, particularmente la membrana y el citoplasma, y en algunos casos, cambian completamente la morfología de las células (Nazzaro et al., 2013).

Los estudios *in vitro* sobre su actividad antimicrobiana han demostrado un gran potencial bactericida, especialmente frente a bacterias Gram negativas, asociado a una gran diversidad de mecanismos de acción (disrupción y/o permeabilización de la membrana celular, envejecimiento del ATP e iones potasio/hidrógeno, inhibición de la actividad *ATPasa*, etc.), lo que dificulta además la aparición de resistencias bacterianas. En el caso de *Salmonella*, son numerosos los estudios que destacan la actividad de los AE de canela, clavo, orégano y tomillo como una alternativa eficaz a los antibióticos para el control de las cepas resistentes (Nazzaro et al., 2013).

Los AE están recibiendo mucha atención como posibles fuentes de terapias alternativas seguras y naturales porque se sabe que poseen varias actividades medicinales, incluyendo antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales y hasta anticancerígenos (Shaaban et al., 2012).

Existe una gran cantidad de datos disponibles sobre el modo de acción de los AE y sus componentes. En la **Tabla 2** se resumen algunos de los mecanismos más frecuentemente reportados en las diferentes revisiones bibliográficas. La interrupción e inhibición de las membranas bacterianas contribuye a las propiedades antibacterianas de la mayoría de los AE. El daño a las proteínas de la membrana (por ejemplo, enzimas), la fuga de contenido celular, el agotamiento de la fuerza motora del protón y la coagulación del citoplasma son también efectos comunes (Gill & Holley, 2006; Langeveld et al., 2014).

También existe un objetivo específico propuesto para los componentes de AE, a saber, la inhibición de las bombas de eflujo que son responsables de la resistencia a los antibióticos (Kollanoor-Johny et al., 2010; Shahverdi et al., 2007). Aunque a menudo se piensa que los inhibidores de la bomba de eflujo son moléculas grandes, alcaloides y lipofílicas, también se propone que las bombas de eflujo pueden inhibirse a través de la interrupción de la membrana y la inhibición de las vías metabólicas (Gibbons, 2008).

Por otra parte, se ha descrito que la inhibición de la producción o actividad de las enzimas bacterianas es también un mecanismo de acción de los AE (Langeveld et al., 2014).

Tabla 2. Mecanismos de acción antibacteriana de los AE y/o sus componentes

AE o componente	Mecanismo de acción	Referencias
Orégano	Reducción de la actividad lipasa y coagulasa, inhibición enzimática	De Barros et al., 2009
Carvacrol	Interrupción de la membrana, inhibición de la actividad <i>ATPasa</i> , membrana Desestabilización, fuga de iones celulares, fluidización de la membrana Lípidos, reducción de la fuerza motriz del protón	Di Pasqua et al., 2007; Gill & Holley, 2006; Ultee et al., 2002
Timol	Interrupción de la membrana con objetivos intracelulares potenciales, alteración de la vía metabólica del citrato	Di Pasqua et al., 2007; Trombetta et al., 2005
<i>p</i> -Cimeno	Interrupción de la membrana	Ultee et al., 2002
Cinnamaldehído	Interrupción de la membrana mediante la inhibición de la actividad <i>ATPasa</i>	Gill & Holley, 2004, Gill & Holley, 2006
Eugenol	Interrupción de la membrana mediante la inhibición de la actividad <i>ATPasa</i> Posible bloqueador de la bomba de eflujo Reducción de varios factores de virulencia a concentraciones subinhibitorias	Bolla et al., 2011; Di Pasqua et al., 2007; Gill & Holley, 2006; Hemaiswarya & Doble, 2009; Qiu et al., 2010
γ -Terpineno	Interrupción de la membrana	Oyedemi et al., 2009

Fuente: Langeveld et al., 2014.

Los principales mecanismos de acción de los AE (**Figura 12**) son los siguientes:

- ✓ Efecto sobre la membrana celular bacteriana.
- ✓ Acción sobre proteínas.
- ✓ Efecto sobre el ATP y la *ATPasa*.
- ✓ Efecto sobre los metabolitos.
- ✓ Acción sobre la morfología celular.

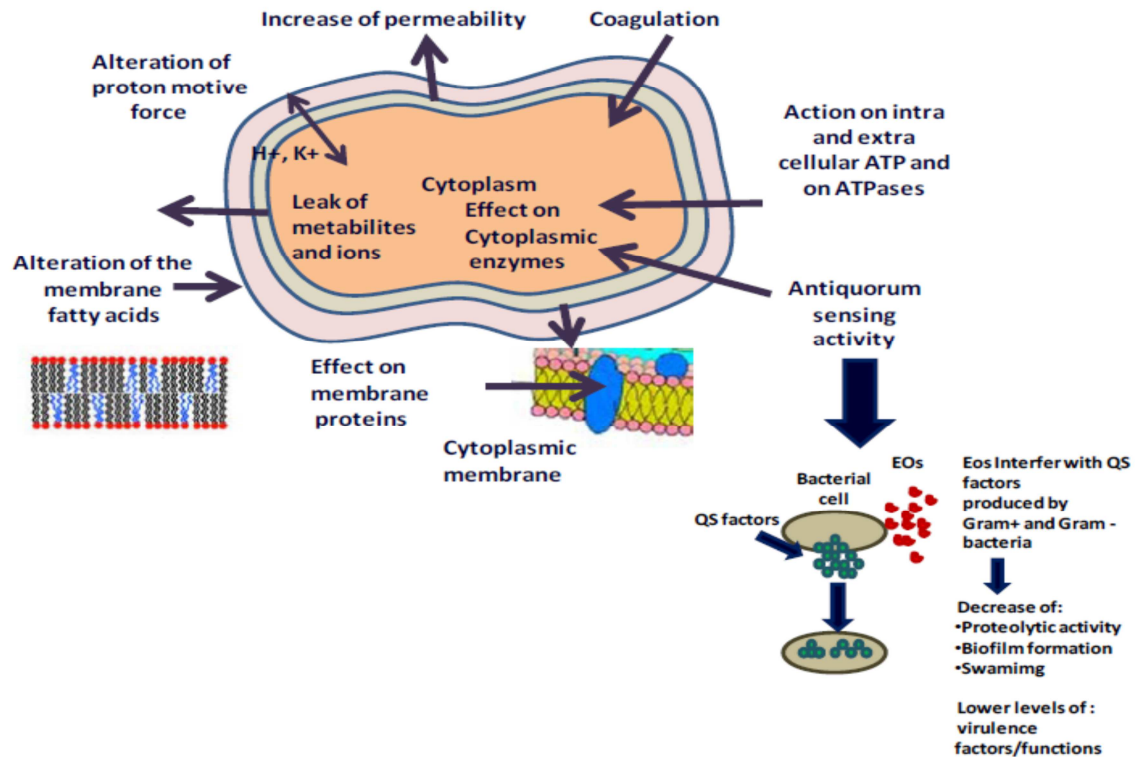


Figura 12. Mecanismo de acción y sitios diana de los aceites esenciales en las células microbianas (Nazzaro et al., 2013)

La actividad de un AE puede afectar tanto a la envoltura externa de la célula como al citoplasma. La hidrofobicidad, típica de los AE, es responsable de la disrupción de las estructuras bacterianas que conduce a una mayor permeabilidad debido a la incapacidad de separar los AE de la membrana celular bacteriana. El carvacrol y el timol son componentes que comúnmente modifican la membrana bacteriana (O'Bryan et al., 2015).

Por otra parte, diferentes componentes de los AE pueden actuar sobre las proteínas presentes en las bacterias afectando su división celular (Lv et al., 2011). El cinamaldehído, por ejemplo, es capaz de inhibir la separación celular. Asimismo, muchas proteínas pueden ser modificadas por la presencia de timol, desencadenando estrés bacteriano (Shaaban et al., 2012).

Los AE al afectar la membrana celular alteran el equilibrio intra y extra celular de ATP, de tal manera que se pierde ATP a través de la membrana alterada (De Sousa et al., 2012). En estudios descritos por Picone et al. (2013), el uso de orégano dio lugar a una reducción más significativa de sus niveles de ATP intracelular; a su vez, el uso de eugenol, cinamaldehído y carvacrol inhibió la generación de ATP a partir de dextrosa y alteró la membrana celular (Nazzaro et al., 2013).

Se ha comprobado que los AE y/o sus componentes ejercen un efecto sobre la producción de metabolitos; cada metabolito individual responde de manera diferente a dosis variables de los AE o sus componentes. Por ejemplo, algunos efectos pueden ocurrir en cantidades bajas de carvacrol, otros sólo en dosis más altas (Shaaban et al., 2012). De igual manera, la exposición de enterobacterias al cinamaldehído puede incrementar la producción de metabolitos, como indol, disulfuro de dimetilo, entre otros (Hossain et al., 2013).

La actividad de los AE y/o sus componentes difiere dependiendo de la forma de las bacterias estudiadas, así se ha descrito que las células bacterianas de forma bacilar (i.e. *S. Typhimurium* y *E. coli*) son más sensibles a los AE que las células cocoides (Nazzaro et al., 2013). Di Pasqua et al. (2006), al tratar diferentes enterobacterias con eugenol, timol y carvacrol, encontró alteraciones en la morfología de las células. Las células tratadas con cinamaldehído mostraron también cambios en su morfología (Langeveld et al., 2014).

En consecuencia, existe una gran controversia sobre el origen del potencial antimicrobiano de los AE. Mientras algunos estudios sugieren que los principios activos mayoritarios (timol, carvacrol, eugenol, etc.) presentan más actividad que el AE completo (Freires et al., 2015), otros autores justifican la compleja

composición química de los AE y el sinergismo entre sus moléculas como la causa de su gran actividad antimicrobiana y la escasa resistencia bacteriana generada (Ait-Said et al., 2015; Rota et al., 2004).

Como corolario, debemos destacar que los distintos principios activos tienen diferentes modos de acción, y la actividad del AE depende de la concentración de sus principios activos, del resto de partículas presentes y la distribución del AE en la célula bacteriana, que determina el tipo de reacción y respuesta biológica (Padalia et al., 2015).

Una vez realizada la revisión de los mecanismos de acción más importantes de los aceites esenciales y/o sus compuestos mayoritarios, consideramos pertinente hacer mención de los posibles “mecanismos de resistencia” que podrían revelar los AE, teniendo en cuenta que estos mecanismos se encuentran inmersos en el estudio de los propios efectos que podrían ocasionar estos compuestos.

RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ACEITES ESENCIALES

Una cuestión importante con respecto a los AE como productos terapéuticos es que si su uso podría generar resistencia bacteriana, comparable con la resistencia inducida hacia antibióticos. En este sentido, es pertinente indicar que el estudio de la resistencia bacteriana a los AE y/o sus componentes activos es un campo de investigación que requiere ser ampliamente explorado.

Existen varios estudios enfocados en determinar el cambio bacteriano debido a la sobre exposición o exposición continuada a los AE, específicamente los trabajos con *Salmonella* han revelado la ausencia de resistencias a los AE (Langeveld et al., 2014).

La exposición de *S. Typhimurium* a pases repetidos en concentraciones sub-letales de AE de orégano vulgar y de carvacrol aparentemente reveló una duplicación de la CMI (Luz et al., 2012), que es en realidad un pequeño aumento en comparación con el desarrollo de la resistencia contra los antibióticos convencionales.

El aparente bajo nivel de inducción de la resistencia hacia los AE podría deberse al hecho de que éstos no atacan a un solo objetivo específico, dado que pueden tener múltiples modos de acción antibacteriana; la presencia de varios componentes con actividad antibacteriana puede dificultar la inducción de resistencia (Becerril et al., 2012). Finalmente, si se considera un modo de acción desestabilizante de la membrana para los AE, puede ser simplemente difícil desarrollar un mecanismo de resistencia que proteja una diana bacteriana tan grande, ya que el cambio de estructuras y/o composición de las membranas resulte probablemente no favorable para la viabilidad de las bacterias (Langeveld et al., 2014).

Sin embargo, los hallazgos de tolerancia relacionada con la bomba de eflujo de *Pseudomonas* spp. hacia los AE demuestran que una defensa eficaz contra estos compuestos es posible (Becerril et al., 2012).

La presencia de concentraciones sub-CMI de AE al pasar las bacterias puede influir en la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos (Fadli et al., 2011; Kon & Rai, 2012).

Estudios con otras enterobacterias gram negativas reveló que el paso de *Serratia marcescens* en el AE de orégano incrementó en dos o tres veces la CMI para la tetraciclina y el ácido nalidíxico, y aumentó en un menor grado las CMI para el cloranfenicol, la minociclina y la ciprofloxacina (Becerril et al., 2012). Por el contrario, el pase de *Proteus mirabilis* en AE de orégano aumentó la susceptibilidad a la ampicilina hasta en ocho veces. *Morganella morganii* y *Pseudomonas aeruginosa* no se vieron afectados por el paso de AE de orégano y la exposición repetida al AE de canela no tuvo efecto significativo en las CMI para las cuatro cepas bacterianas y todos los antibióticos probados (Becerril et al., 2012).

Aunque las observaciones iniciales indican que la inducción de la resistencia hacia los AE es baja, se necesitan más estudios usando diferentes AE y bajo diferentes condiciones para confirmar convincentemente estas observaciones. Además, se requieren más estudios que aborden la inducción de resistencia hacia componentes AE únicos o enteros.

TOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

En términos generales, la práctica con AE como aditivos alimentarios y potenciales terapéuticos se considera segura. No obstante, su uso inadecuado puede resultar en efectos adversos como irritación o cambios malignos en la piel por aplicación tópica excesiva y episodios convulsivos, hepato-toxicidad y daño renal cuando la absorción sistémica es alta (Bilia et al., 2014; Sienkiewicz et al., 2012). Se ha demostrado que los AE generan especies reactivas de oxígeno resultando en fragmentación del ADN (Bakkali et al., 2008; Sperotto et al., 2013).

Al igual que sucede con la actividad antimicrobiana, la toxicidad de los AE puede variar en función de su quimiotipo, es así como existe una gran variabilidad fitoquímica entre distintos ejemplares de una misma especie, como ocurre con los diferentes quimiotipos del tomillo (*Thymus vulgaris*) (Gutiérrez, 2006).

Ingeridos por vía oral en dosis altas los AE de canela y clavo, pueden ocasionar cuadros de depresión generalizada en el SNC. Se han descrito, asimismo, efectos narcóticos y estupefacientes para el AE de tomillo, siendo el timol el compuesto fenólico responsable de dicho efecto (Lis-Balchin et al., 1999; Madeira et al., 2002).

Un importante grupo de AE es el de fototóxicos o irritantes dérmicos presentes, entre otras, en las especies de tomillo, siendo en este caso el timol y el carvacrol los componentes activos responsables. A su vez, el AE tomillo pueden generar desde edemas, ampollas o vesículas, hasta lesiones cáusticas, lesiones cancerosas e hiperpigmentación de la piel (Artuz & Restrepo, 2002).

Si bien se han descrito efectos de somnolencia por el uso de AE de orégano a dosis altas (Madeira et al., 2002), recientes estudios *in vivo* en ratas no revelaron

mortalidad ni efectos adversos relacionados con el uso del AE de orégano (*Origanum vulgare*) (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2017).

La declaración de Paracelsus sigue siendo verdadera y se hace evidente a lo largo de los siglos: “*Todas las sustancias son venenos; no hay ninguno que no sea un veneno. La dosis correcta diferencia un veneno y un remedio*” (Paracelsus, pp. 1493–1541). Dado que los AE son sustancias fluidas altamente concentradas, rara vez se utilizan en forma no diluida. Antes de la aplicación, los AE se mezclan primero con un aceite portador. Esta mezcla diluye los AE para que sean seguros, y también ayuda a disminuir la tasa de evaporación (Lahlou, 2004).

Estudios *in vitro* en células intestinales frente a otras enterobacterias (*E. coli*) describen un efecto citotóxico dosis dependiente por encima 500 µg/mL de los AE, la evaluación de la muerte celular demostró que los AE de canela y clavo, y su componente principal eugenol, no tenían casi ningún efecto citotóxico en dosis más bajas. Aunque el AE de orégano y su componente carvacrol aumentaron ligeramente la incidencia de muerte celular apoptótica, mostraron una amplia actividad antimicrobiana incluso a concentraciones más bajas. Se demostró la citotoxicidad relativamente alta del AE de tomillo, que aumentó tanto la incidencia de muerte celular apoptótica como necrótica. Por el contrario, su componente timol no mostró ningún efecto citotóxico (Dušan et al., 2006).

Sin embargo, Fabio et al. (2007), indicaron que el tomillo parece ser el AE más prometedor en comparación con los AE de canela y clavo, mostrando una marcada actividad inhibitoria contra microorganismos responsables de infecciones respiratorias, con una baja citotoxicidad (200 µg/mL la concentración no tóxica más alta).

Por otra parte, Dantas et al. (2016), indicaron que el AE de orégano no fue capaz de inducir mutaciones *in vitro* de genes (en cepas de *S. Typhimurium*) y cromosomas (V79, células de fibroblastos de pulmón de hámster chinos), demostrando que éste AE no reveló actividad mutagénica.

FARMACOCINÉTICA (PK)/ FARMACODÍNAMICA (PD) DE LOS AE

Dada la compleja composición química de los AE y su condición de aditivos alimentarios, no encontramos estudios sobre sus propiedades PK y PD, ni el desarrollo de modelos PK/PD, centrándose exclusivamente en estudios sobre los principales componentes activos que no constituyen el objeto de esta Tesis.

ENSAYOS *IN VIVO*

Por su condición de aditivos alimentarios, en los últimos años los AE se han evaluado como una alternativa en la nutrición de aves (principalmente en pollos de engorde), cerdos, rumiantes (Hernández et al., 2004; Jamroz et al., 2003; Mitsch et al., 2004; Williams & Losa, 2002), y peces (Abdollahzadeh et al., 2014; Tongnuanchan et al., 2013). Así mismo, se han usado para la prevención de ciertas enfermedades, como la salmonelosis de los animales (Daza et al., 2001).

La mayoría de los estudios *in vivo* de los AE se han realizado con el fin de evaluar su efecto e influencia en parámetros productivos (ganancia de peso, conversión alimenticia, entre otros) en animales de granja, principalmente en aves y cerdos (Isabel & Santos, 2009; Martínez et al., 2015).

En los ensayos *in vivo* para valorar la actividad de los AE sobre el rendimiento y la flora intestinal del cerdo, se ha observado una mejora productiva asociada a su efecto regulador del metabolismo gastroentérico y a su actividad

inmunoestimulante, antioxidante, antibacteriana y antiinflamatoria (Allan & Bilkey, 2005). Otras investigaciones *in vivo* en cerdos de granja demostraron que al utilizar de 2 a 3% de AE en la dieta en base seca se encontró un efecto positivo en la digestibilidad de los nutrientes; también se observó mayor crecimiento del animal, aunque aumentó la producción de amoníaco (Yan et al., 2010).

Por otra parte, ensayos experimentales en gallinas ponedoras comprobaron la eficiencia de un producto comercial basado en el AE de clavo (*Eugenia caryophyllata*) frente a la infección experimental con *Salmonella* Enteritidis, con menor porcentaje de detección de *S. Enteritidis* en animales infectados y tratados (8,3%) frente a la detección de este patógeno en animales infectados y no tratados (12,5%) (Huerta et al., 2005).

Así mismo, en los últimos años se describe el uso de los AE como biopreservadores, con el objetivo de aumentar la calidad global de la alimentación (Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2012), y preventivos de la carga de *Salmonella* en dietas animales y formulados como única adición o en combinación con otros componentes como los ácidos orgánicos (Walia et al., 2017).

Si bien, la actividad *in vitro* de un antimicrobiano no siempre puede corresponderse con su eficacia *in vivo*. Es posible que como consecuencia de la dilución y absorción del fármaco en estómago, intestino y sangre, la concentración inhibitoria alcanzada a nivel de intestino delgado por el constituyente activo de muchos antimicrobianos sea sólo 1/20 o menos de la dosis inicial (Lahlou, 2004). La gran ventaja del uso de AE es que se pueden agregar fácilmente a los piensos como suplementos dietéticos, mediante mezclas encapsuladas (Walia et al., 2017).

Cabe señalar que no todos los AE se administran de la misma manera. Algunos se suministran en el alimento, en el agua de bebida, por aspersión, o se

aplican directamente en la piel, dependiendo del problema a tratar. Para el caso de la salmonelosis, la vía oral, es de elección para la administración de los AE (Martínez et al., 2015).

Por último, es importante considerar la disponibilidad y los recursos que se tienen dentro de una región para obtener y hacer uso de AE locales, dependiendo menos de productos químicos y logrando que los sistemas de producción animal sean sostenibles y tengan bajo impacto ambiental. Si bien se precisan más estudios *in vivo* sobre su palatabilidad, toxicidad y posible combinación con antibióticos para disminuir la dosis de administración de ambos y evitar así efectos adversos y resistencias (Ait-Said et al., 2015; Allan & Bilkey, 2005; Naveed et al., 2013; Peñalver et al., 2005).

LIMITANTES

Actualmente, los AE están autorizados para su uso como aditivos alimentarios por lo que no existe un método de estudio estandarizado. Asimismo, la aplicación de técnicas descritas por el CLSI para los antimicrobianos se dificulta debido a la naturaleza hidrófoba de los AE, siendo ésta la principal limitante para obtener una alta repetibilidad en los ensayos realizados con los AE (Gutiérrez, 2006).

Si bien los limitantes en el uso y aplicación de los AE se atribuyen principalmente a su naturaleza fotosensible, volátil e hidrofóbica (Herman et al., 2013). Sin embargo, uno de los sistemas que ha merecido especial atención para la encapsulación de AE ha sido el uso de emulsiones (Đorđević et al., 2015). La finalidad de una emulsión es lograr que los compuestos de naturaleza hidrofílica e

hidrofóbica puedan coexistir de manera más estable, permitiendo el incremento de la biodisponibilidad de los componentes bioactivos (López et al., 2017).

Por su compleja composición química, son además numerosos los factores que pueden determinar diferencias en la concentración de los principios activos de los aceites esenciales (origen geográfico de la planta, parte de la planta utilizada, método de extracción, etc.) (Rosato et al., 2007). Para este estudio se utilizaron productos comerciales a fin de minimizar las variaciones en la concentración.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Valorar el potencial de cinco aceites esenciales para su uso, solos o en combinación con antimicrobianos, en el control de la infección por *Salmonella* spp. en los animales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Valorar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de canela, clavo, orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar frente a una amplia muestra de los principales serotipos de *Salmonella* implicados en toxiinfecciones alimentarias y sanidad animal, mediante:

- ✓ Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) y potencial microcida.
- ✓ Estudio de la distribución de la sensibilidad bacteriana a los aceites esenciales: cálculo de la CMI_{50 y 90} y CMB_{50 y 90}.
- ✓ Determinar diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas bacterianas en función de diversos factores (aislamiento, serotipo, resistotipo, etc.).

2. Estudiar el efecto de la combinación de los aceites con los principales antimicrobianos utilizados para el control de la infección por *Salmonella* en los animales, mediante:

- ✓ Determinación del Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF).

3. Determinar la posible aparición de subpoblaciones de cepas de *Salmonella* spp. mutantes de un solo paso resistentes al aceite esencial de orégano, mediante:

- ✓ Estimación de la Concentración de Prevención de Mutantes (MPC).

CAPÍTULO III

OBJETIVO 1

Introducción

Material y Métodos

Resultados

Discusión



III. OBJETIVO 1.

Valorar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de canela, clavo, orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar frente a una amplia muestra de los principales serotipos de *Salmonella* implicados en toxiinfecciones alimentarias y sanidad animal:

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una de las principales zoonosis que afectan al hombre y a los animales, con especial relevancia en la producción intensiva de cerdos, vacunos y aves (OIE, 2017).

La principal estrategia de control en sanidad animal es la administración de antibióticos, que rara vez previenen el estatus de portador (Mith et al., 2014). Investigadores y organizaciones internacionales han argumentado que la administración de AMB a animales permite la aparición y selección de bacterias resistentes en la cadena alimentaria, siendo la principal causa de la mayor incidencia de resistencia a los antimicrobianos en seres humanos (Carramiñana et al., 2004; FDA, 2013).

En este sentido, el último informe publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA & ECDC, 2016), sobre la susceptibilidad a los antimicrobianos en las bacterias zoonóticas destacó el alto nivel de resistencia a los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados en humanos y animales (pollos de engorde, cerdos y ganado bovino) para *Salmonella* y *Campylobacter* y la difusión generalizada de cepas multirresistentes (MDR) en toda Europa.

Tras la prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento animal (Reglamento 1831/2003/CE), se han incrementado los estudios para buscar alternativas eficaces entre productos naturales como los ácidos orgánicos y los AE extraídos de plantas y especias. Actualmente, los AE están autorizados para su uso en alimentación humana y animal como aditivos alimentarios. Como consecuencia de ello, no existe un protocolo estandarizado, ni puntos de corte establecidos para determinar el carácter sensible o resistente de los microorganismos (Dubois-Brissonnet et al., 2011; Huerta et al., 2016; Silva et al., 2013). Por otro lado, los trabajos *in vivo* y con líneas celulares han demostrado una acción citotóxica relacionada con la dosis de aplicación (Dušan et al., 2006). Este efecto parece ser mínimo en el caso de algunos AE como el clavo, la canela y el tomillo observando, además, que su aplicación conjunta con determinados antimicrobianos permite disminuir las dosis de ambos, reduciendo de este modo sus efectos secundarios y las resistencias antimicrobianas (Fabio et al., 2007; Langeveld et al., 2014).

En el caso de *Salmonella*, los trabajos publicados destacan especialmente la actividad antimicrobiana de los AE de orégano, tomillo, canela y clavo, si bien algunos autores describen cierta variabilidad en su actividad para diferentes serotipos de *Salmonella enterica* (Luz et al., 2014; Mith et al., 2014; Peñalver et al., 2005). Encontramos, además, que la mayoría de estudios probaron sólo las cepas de referencia de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, y/o un número reducido de cepas de campo (inferior a 30), obteniendo, por tanto, datos de escasa precisión sobre la distribución de la susceptibilidad de la población bacteriana y la CMI y CMB (50 y 90) (Freires et al., 2015; Rota et al., 2004; Schwarz et al., 2010). De

igual modo, el tamaño de la muestra de estos estudios no ha permitido estimar los puntos de corte de susceptibilidad/resistencia, para lo que se precisa estudiar al menos 500 cepas (MacGowan & Wise, 2001).

Para valorar la actividad antimicrobiana de los AE de canela, clavo, orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar o común frente a *Salmonella enterica*, diseñamos los siguientes protocolos de estudios:

- ✓ Determinación de la distribución de la CMI y la CMB de los cinco AE frente a esta bacteria.
- ✓ Estimación de la susceptibilidad bacteriana mediante el cálculo de la CMI_{50 y 90} y la CMB_{50 y 90}.
- ✓ Determinación del potencial microcida de los AE.
- ✓ Comparación de la susceptibilidad a los AE de los dos principales serotipos no tifoideos implicados en las toxiinfecciones alimentarias en países occidentales (Typhimurium y Enteritidis), a fin de valorar diferencias significativas.
- ✓ Comparación de la susceptibilidad de las cepas en cada uno de estos serotipos para identificar posibles perfiles de resistencia a los AE.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL DE ESTUDIO

Cepas bacterianas

Para alcanzar los dos objetivos principales de este estudio, fue preciso cumplir las siguientes premisas para el cálculo del tamaño de la muestra: (i) garantizar la precisión de los valores de la CMI y la CMB (50 y 90), mediante el

estudio del mayor número posible de cepas de *S. enterica*, preferentemente de origen clínico, y que este número fuese superior a 30 (García, 2008; Schwarz et al., 2010); (ii) muestra representativa del mayor número posible de serotipos de *S. enterica*; y (iii) para comparar los dos principales serotipos no tifoideos implicados en las toxiinfecciones alimentarias en países occidentales (Typhimurium y Enteritidis) (MAPAMA, 2016), el número de cepas de cada serotipo debía ser igual a 30.

En base a ello, en este trabajo se estudiaron un total de 85 cepas, 84 de ellas clínicas, incluyendo cepas sensibles y resistentes a los antimicrobianos, más la cepa de referencia *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, procedente del ‘*American Type Culture Collection*’ (ATCC). Las cepas clínicas fueron obtenidas a partir de la colección de cultivos del Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) Algete-Madrid (España) y el cepario del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba (España); en este último caso, las cepas fueron aisladas entre 1997 y 2016 a partir de casos clínicos en distintas especies animales. El aislamiento, serotipificación, fagotipificación y perfil de resistencia antimicrobiana se realizó según recomendaciones del Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (LNRSE, Madrid-España), utilizando los bacteriófagos específicos suministrados por el Laboratorio Internacional de Referencia de Fagotipia en *Salmonella* (Colindale, Londres-Reino Unido). En la **Tabla 3** se describe la información proporcionada sobre el origen, serotipificación, fagotipificación y perfil de resistencia antimicrobiana (resistotipo) de las cepas ensayadas en este trabajo (Astorga et al., 2002; 2005; 2007; Solarte, 2016).

Las cepas utilizadas procedían de diferentes especies animales (caballo, cerdo, jabalí, cabra, oveja, vaca, pollo, pavo, perdiz, conejo, canario, mono, cobaya, ratón, geko y pitón) y pertenecían a los siguientes serotipos: Typhimurium (30), Enteritidis (30), Choleraesuis (5), Pullorum (1), Newport (1), Virchow (1), Hadar (1), Infantis (1), Anatum (1), Oranienburg (1), Essen (1), Fluntern (1), Senftenberg (1), London (1), Mbandaka (1), Bovismorbificans (1), Bredeney (1), Agona (1), Havana (1), Goldcoast (1), Mikawasima (1), Montevideo (1), Ohio (1).

Todas las cepas ensayadas en este estudio se conservaron hasta su utilización a -20 °C en sistema de criobolas (Criobank TM, Londres-Reino Unido).

Tabla 3. Listado de cepas de *Salmonella enterica* utilizadas en la presente tesis doctoral

Cepa	Referencia	Especie	Serotipo	Fagotipo	Resistotipo
1	697/98	conejo	Typhimurium	104b	S Su
2	698/98	caballo	Typhimurium	104b	A S Su G
3	13/00	perdiz	Typhimurium	U-302	A C S Su T Cef
4	13/00-1	perdiz	Typhimurium	U-302	A C S Su T
5	503/04	potro	Typhimurium	PNR	C S
6	504/04	potro	Typhimurium	PNR	A S SxT
7	631/03	potro	Typhimurium	15a	T Cef
8	171/04	yegua	Typhimurium	U302	A S SxT T
9	733/02	perdiz	Typhimurium	204a	A S Su T
10	397/02	perdiz	Typhimurium	204c	A C S Su T Cef
11	25/00-1	canario	Typhimurium	40	Ninguno
12	25/00	canario	Typhimurium	40	Ninguno
13	168/04	cerdo	Typhimurium	U302	A C S SxT T Cef
14	510/04	perdiz	Typhimurium	193	A C S SxT T G Enr
15	151/05	lechón	Typhimurium	PNR	A S Su T
16	173/05	lechón	Typhimurium	PNR	A S Su T
17	590/05	lechón	Typhimurium	PNR	A S Su SxT T
18	148/06	perdiz	Typhimurium	PNR	A C S Su
19	148/06-1	perdiz	Typhimurium	PNR	Ninguno
20	148/06-2	perdiz	Typhimurium	PNR	A C S Su
21	592/06	cerdo	Typhimurium	PNR	A C S Su T
22	770/99	cerdo	Typhimurium	PNR	Ninguno
23	CECT 7162/03	cerdo	Typhimurium	U302	A Su SxT T
24	00/15	cobaya	Typhimurium	PNR	A C S Su T
25	MG3/97	gallina	Enteritidis	35	A
26	GA7/97	gallina	Essen	PNR	A
27	234/98	pollitos	Enteritidis	1	A C S Su T Cef
28	503/98	mono	Enteritidis	6a	A T
29	503/98-1	mono	Enteritidis	6a	A
30	503/98-2	mono	Enteritidis	6a	A
31	531/98	jabalí	Choleraesuis	PNR	A T
32	531/98-1	jabalí	Choleraesuis	PNR	A
33	163/99	cabra	Anatum	PNR	Ninguno
34	632/01	gallina	Gallinarum	PNR	Ninguno
35	646/02	ratón	Enteritidis	21	Ninguno
36	656/02	yegua	Enteritidis	21	A
37	710/02	caballo	Enteritidis	33	G
39	786/02	cabra	Enteritidis	PNR	Ninguno
40	351/03	pollitos	Enteritidis	1	Cef
41	546/03	caballo	Oranienburg	PNR	T Cef G
42	625/03	geko	Fluntern	PNR	Ninguno
43	720/03	potro	Hadar	10	A C S T Cef
45	45/05	jabalí	Choleraesuis	PNR	A Am Gen
46	329/05	jabato	Choleraesuis	PNR	S
47	329/05-1	jabato	Choleraesuis	PNR	S
51	ATCC14028	Cepa Ref.	Typhimurium	NT	Ninguno
52	3/00	pollitos	Enteritidis	PNR	Cef

Tabla 3. Continuación.

Cepa	Referencia	Especie	Serotipo	Fagotipo	Resistotipo
53	646/02	pitón	Enteritidis	35	A T Cef
54	1 UCO	porcino	Typhimurium	PNR	S Col
55	4 UCO	porcino	Typhimurium	PNR	S Neo Col
56	12 UCO	porcino	Typhimurium	U302	A Am G S Su SxT C T Col Nit
57	3 UCO	porcino	Typhimurium	104b	A Am S Su C T Col Nit
58	4 UCO	porcino	Typhimurium	104b	A Am S Su C T Col Nit
59	245/19	broilers	Senftenberg	PNR	Ninguno
60	246/46	pavo	London	PNR	A T Cip SxT Enr
61	245/13	broilers	Mbandaka	PNR	A C T W
62	250/04	porcino	Bovismorbificans	PNR	A C S Su SxT T G
63	244/86	pavo	Bredeney	PNR	T W
64	245/40	broilers	Agona	PNR	T W
65	246/13	broilers	Havana	PNR	Cip
68	251/13	ponedoras	Infantis	PNR	Ninguno
70	245/16	broilers	Enteritidis	PNR	Cip Nd Ct
73	254/66	ponedoras	Goldcoast	PNR	A T W
81	251/15	ponedoras	Enteritidis	PNR	A T Cip Nd Enr
82	244/21	reproductoras	Enteritidis	PNR	Ninguno
83	244/43	broilers	Mikawasima	PNR	A Cip
84	246/29	pavo	Montevideo	PNR	A C T Cip W
86	248/70	ponedoras	Enteritidis	PNR	T Cip Nd SxT Enr
87	254/60	pavo	Newport	PNR	A G
88	247/70	ponedoras	Enteritidis	PNR	Ninguno
89	252/95	broilers	Enteritidis	PNR	Ninguno
91	247/47	ponedoras	Enteritidis	PNR	Cip Nd Ct
92	255/11	ponedoras	Enteritidis	PNR	Cip Nd
93	251/53	ponedoras	Enteritidis	PNR	Ninguno
94	253/91	ponedoras	Enteritidis	PNR	Ninguno
95	256/00	ponedoras	Enteritidis	PNR	A T Cip Nd Enr
96	245/11	ponedoras	Enteritidis	PNR	Ninguno
97	245/17	broilers	Virchow	PNR	Cip Nd
98	250/80	broilers	Enteritidis	PNR	Cip Nd
99	249/98	ponedoras	Enteritidis	PNR	Ninguno
100	244/28	ponedoras	Enteritidis	PNR	Cip Nd Ct
101	243/92	ponedoras	Enteritidis	PNR	Cip Nd Ct
102	253/04	ovino	Enteritidis	PNR	Ninguno
103	251/14	ponedoras	Ohio	PNR	Ninguno
104	120/28	vacuno	Enteritidis	PNR	Ninguno

A: ampicilina, Am: Amoxicilina, C: cloranfenicol, Cef: Cefotiofur, Cip: ciprofloxacina, Col: Colistina, Ct: cefotaxima, Enr: enrofloxacina, G: gentamicina, Nd: ácido nalidíxico, Nit: Nitrofurantoína, S: estreptomicina, Su: sulfonamida, SxT: trimetoprim-sulfametoxazol, T: tetraciclina, W: Trimetoprim.

NT: cepa No Tipable // PNR: Patrón no reconocido

Aceites esenciales

El objeto de estudio de esta Tesis son los AE de canela, clavo, orégano, tomillo común y tomillo rojo; todos ellos de origen natural con una pureza de $\geq 98\%$, adquiridos de un único fabricante (Aromium®, Barcelona-España). Los AE fueron seleccionados en base a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación con enterobacterias y en base a los resultados obtenidos por otros autores (Gutiérrez, 2006; Huerta et al., 2004; Peñalver et al., 2005; Silva et al., 2013; Soković et al., 2010; Solarte, 2016).

La lista de los AE utilizados, nombre científico y nombre común, origen geográfico, parte de extracción de la planta y principales componentes activos se detallan en la **Tabla 4**, en base a los datos aportados por el fabricante mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC). En el **Anexo 1**, se adjunta información con la composición química de los AE proporcionada por Aromium® a través de su página Web o correo personal con los autores.

Tabla 4. Lista de aceites esenciales probados en la presente tesis doctoral y su quimiotipo.

N° de Registro	Nombre común	Especie botánica	Familia	Parte de la planta	Origen	Principales compuestos activos
AR007AE	Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Lauraceae	Corteza	Sri-Lanka	Cinamaldehído (69,18%), Linalool (3,19%), Eugenol (3,03%)
AR014AE10	Clavo	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Myrtaceae	Brotes	Sri- Lanka	Eugenol (85-90%), Acetato de eugenilo (5-10%), β -Caryophyllene (0-5%)
AR071AE10	Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Planta floreciendo	España	Carvacrol (63,01%), Timol (10,56%), γ -Terpineno (8,11%)
AR158AE	Tomillo común	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Hojas y flores	España	Timol ND , <i>p</i> -Cimeno ND , Linalool ND , 1,8 Cineool ND , Carvacrol ND
AR189AE05	Tomillo rojo	<i>Thymus zygis</i>	Lamiaceae	Hojas y flores	España	Timol (46,90%), <i>p</i> -Cimeno (21,72%), γ -Terpineno (9,32%), Linalool (4,8%)

* Basado en los datos proporcionados por el fabricante (Aromium®) – HPLC análisis.

ND: Datos no aportados por el fabricante.

Los estudios químicos realizados por otros autores (Acosta et al., 2000; Ahmad et al., 2014) para el AE de tomillo común refieren la siguiente composición: Timol (32,6%-60,18%), *p*-Cimeno (15,44%), Linalool (2,18%-4,22%), 1,8 Cineool (0,24%), Carvacrol (2,88%).

MÉTODOS

Preparación del inóculo bacteriano

Siguiendo las normas CLSI (2015) para pruebas de susceptibilidad *in vitro* con patógenos de origen animal, los productos de ensayo debían enfrentarse en los pocillos de las placas de microtitulación (Greiner Bio-one, Barcelona, España) con un inóculo bacteriano final de 5×10^5 UFC/mL.

Para ello y previamente al inicio del ensayo se procedió a recuperar las cepas conservadas en criobolas mediante dos pases de 24 h a 37 °C, primero en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y posteriormente en agar Tripticasa Soja (TSA) (Oxoid Ltd.). A partir de este último cultivo, se preparó un inóculo con $1,5 \times 10^8$ UFC/mL mediante suspensión directa de varias colonias en solución salina estéril hasta alcanzar una densidad óptica de 0,08-1 (λ 595 nm), correspondiente al 0,5 de la escala MacFarland. A continuación, se añadieron 100 μ L de esta suspensión bacteriana en 9,9 mL de caldo Müller-Hinton (MH) (Oxoid Ltd.) para obtener un inóculo con 10^6 UFC/mL, finalmente utilizado en los pocillos para obtener la concentración de ensayo deseada.

Los inóculos bacterianos fueron siempre usados en los 15 minutos siguientes a su preparación.

Método de microdilución en caldo

Para determinar la CMI y la CMB de los AE ensayados se utilizó el método de microdilución en caldo descrito por el CLSI (2015) para los estudios de susceptibilidad con antimicrobianos. Se prepararon diluciones dobles seriadas de

cada AE en caldo MH suplementado con 1% de agar (Oxoid Ltd.), de forma que las concentraciones finales en pocillo fueran de 10000 $\mu\text{g/mL}$ a 78,125 $\mu\text{g/mL}$.

El ensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos (Greiner Bio-one, Barcelona, España). Cada pareja cepa-AE se probó por triplicado dispensando en cada pocillo 100 μL de dilución de AE y 100 μL de inóculo bacteriano (10^6 UFC/mL). De este modo, la concentración final de la bacteria en el pocillo fue de 5×10^5 UFC/mL.

En todos los ensayos se incluyeron controles de crecimiento positivo (caldo sin aceite con inóculo bacteriano) y negativo (caldo sin aceite y sin inóculo). Como control de calidad se utilizó enrofloxacin HPLC al 98% de pureza (Sigma Aldrich Co. LLC., St. Louis, EE.UU.) y la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922. La cepa de referencia *S. Typhimurium* ATCC 14028 se incluyó dentro de las cepas ensayadas en el estudio (**Figura 13**).

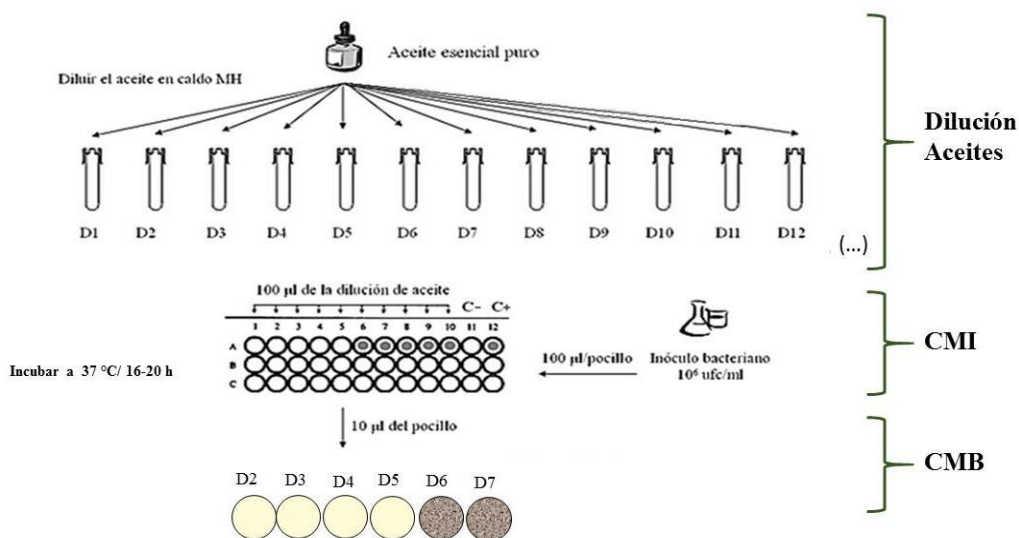


Figura 13. Método de microdilución en caldo para los aceites esenciales

(Esquema basado en el protocolo descrito por el CLSI (2015))

Tras inocular a 37 °C durante 16-20 horas, se determinó la CMI como la menor concentración de aceite capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria en los pocillos (**Figura 13 y 14**).

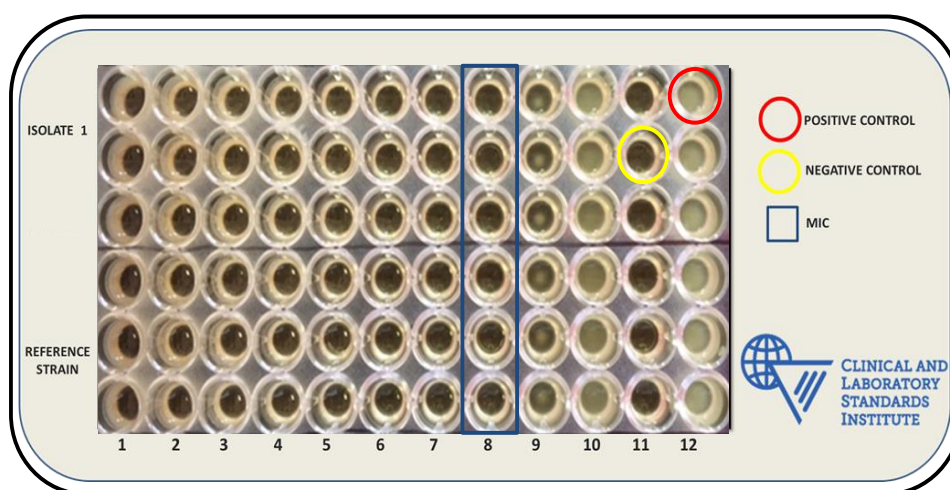


Figura 14. Determinación de la concentración mínima inhibitoria en placa

Para determinar la CMB, se sembraron en placas de agar MH (Oxoid) 10 µL de los cuatro últimos pocillos sin crecimiento bacteriano visible y los dos siguientes a la CMI, como control del método. Después de incubar a 37 °C durante 24 horas, se determinó la CMB como la menor concentración de aceite capaz de destruir el 99,9% del inóculo presente en el pocillo, en base a la ausencia total de colonias en la placa de agar (**Figura 13**).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la hoja de cálculo SPSS Software 18,8 (IBM Company, Nueva York, EE.UU.) y Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, EE.UU.). Las variables dependientes (CMI y CMB) se trataron como variables numéricas ordinales con 8 categorías, según el rango de diluciones dobles seriadas de los AE.

Para determinar la distribución de frecuencias de la CMI y la CMB de los AE frente a *Salmonella enterica* se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados a las 85 cepas, en vez del resultado más alto como suele ser habitual en los test con antimicrobianos. Esta decisión se tomó en base a la moderada repetibilidad del método de microdilución con AE, a fin de no perder información (Huerta et al., 2005), y tras comprobar que los valores de la CMI (50 y 90) y la CMB (50 y 90) no variaban con el criterio adoptado.

A partir de cada distribución se estimaron los valores de CMI₅₀ y 90 y los valores de CMB₅₀ y 90 de cada AE frente a *S. enterica*, entendidos como la dilución de producto capaz de inhibir y destruir el 50% y el 90% de las cepas ensayadas, respectivamente (Chueca et al., 2016). Finalmente, se evaluó el potencial microcida calculando el índice CMB/CMI para los valores 50 y 90 y comparándolo con los criterios establecidos por Montravers & Dupont (1996) (índice <4 bactericida, índice ≥ 4 bacteriostático).

En el caso de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* se realizó una comparación de su susceptibilidad a cada uno de los AE mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (nivel de significación $P = 0,05$).

Por último, se representaron gráficamente los valores de CMI obtenidos para cada una de las cepas de los serotipos Typhimurium y Enteritidis, a fin de identificar posibles perfiles de resistencia a los AE probados.

RESULTADOS

Siguiendo el protocolo para el estudio de nuevos antimicrobianos desarrollado en la introducción general, el principal objetivo de esta Tesis fue realizar uno de los primeros trabajos sobre la distribución de la susceptibilidad de *S. enterica* a los AE con mayor potencial en los ensayos *in vitro* previos. Aunque no se ha establecido un método estandarizado, se trató de seguir en todo momento las normas establecidas por el CLSI (2015) para el estudio de los antimicrobianos, si bien encontramos una importante limitación en la interpretación de los resultados al no existir actualmente puntos de corte para determinar la susceptibilidad o resistencia de la cepa bacteriana. En la distribución de la CMI y la CMB de los AE sólo podemos, por tanto, reseñar los valores más frecuentes sin determinar porcentajes de resistencia.

Para este trabajo se decidió incluir los resultados de todos los ensayos ya que, si bien la mayoría de cepas mantuvieron un comportamiento constante en las tres pruebas realizadas por AE, observamos en ocasiones una notable variabilidad posiblemente asociada a la solubilidad en el caldo de los AE. En el **Anexo 2** se presentan los valores de CMI y CMB (por ensayo y cepa), los valores máximos y la mediana.

Como se aprecia en la **Tabla 5**, se encontró para cada AE un rango de valores más probables: entre 625 y 1250 µg/mL para canela y clavo y entre 312,5-

625 µg/mL para orégano, tomillo rojo y tomillo común. No obstante, se hallaron aislamientos con valores de CMI y CMB notablemente más altos en los 3 ensayos para determinados AE (ej. cepa nº 2 presentó una CMI de 5000 µg/mL y una CMB de 10000 µg/mL para el tomillo común) (**Anexo 2**).

A partir de las distribuciones, se estimaron los valores de CMI y CMB (50 y 90) de cada uno de los AE para *S. enterica*. El orégano, el tomillo rojo y el tomillo común mostraron la mayor actividad, inhibiendo y destruyendo el 90% de las cepas estudiadas (CMI₉₀ y CMB₉₀) a una concentración de 625 µg/mL, frente a canela y clavo que precisaron una concentración de 1250 µg/mL. Si consideramos la CMI₅₀ y CMB₅₀, el orégano fue el AE con mayor potencial (312,5 µg/mL) (**Tabla 5**).

La determinación del índice microcida (CMB₉₀ /CMI₉₀) mostró valores iguales a uno en todos los casos, demostrando el carácter bactericida de estos AE (Montravers & Dupont, 1996).

Tabla 5. Distribución de frecuencia de las concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas (CMI y CMBs) de cinco aceites esenciales frente a *Salmonella enterica*. Descripción de los parámetros estadísticos determinados a partir de estos resultados.

Distribución de frecuencia CMIs									Parámetros estimados*	
Aceites esenciales	Diluciones testadas (µg/mL) & N° ensayos de cada resultado								CMI ₅₀	CMI ₉₀
	78,125	156,25	312,5	625	1250	2500	5000	10000	(µg/ml)	(µg/mL)
Canela	0	0	42	123	86	4	0	0	625	1250
Clavo	0	0	2	56	196	1	0	0	1250	1250
Orégano	0	3	168	78	2	4	0	0	312,5	625
T. común	0	2	115	133	1	1	3	0	625	625
T. rojo	0	1	97	151	0	6	0	0	625	625

Distribución de frecuencia CMBs									Parámetros estimados *	
Aceites esenciales	Diluciones testadas (µg/mL) & N° ensayos de cada resultado								CMB ₅₀	CMB ₉₀
	78,125	156,25	312,5	625	1250	2500	5000	10000	(µg/mL)	(µg/mL)
Canela	0	0	20	102	124	4	5	0	1250	1250
Clavo	0	0	2	47	196	10	0	0	1250	1250
Orégano	0	1	161	87	2	2	2	0	312,5	625
T. común	0	2	101	132	16	1	0	3	625	625
T. rojo	0	1	80	163	5	3	3	0	625	625

* Se han utilizado los resultados de los tres ensayos realizados a cada una de las 85 cepas de este estudio (total 255).

CMI₅₀ y CMB₅₀: Concentraciones obtenidas en el 50% de los ensayos (128/255 ensayos).

CMI₉₀ y CMB₉₀: Concentraciones obtenidas en el 90% de los ensayos (230/255 ensayos).

En base a la variabilidad observada en los resultados publicados por otros autores para la CMI y la CMB de diferentes serotipos de *S. enterica* (Huerta et al., 2004; Mith et al., 2014; Peñalver et al., 2005), se comparó la susceptibilidad de los serotipos Typhimurium y Enteritidis (frecuentemente implicados en las salmonelosis humanas y animales) para cada uno de los AE de nuestro ensayo.

Los resultados mostraron diferencias significativas ($P \leq 0,003$) en la susceptibilidad de ambos serotipos para todos los AE, destacando especialmente la mayor susceptibilidad de *S. Typhimurium* al AE de clavo y de *S. Enteritidis* al AE de canela.

Finalmente se comparó, para cada uno de los serotipos Typhimurium y Enteritidis, la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas analizadas a fin de identificar posibles perfiles de resistencia a los AE. Para la representación gráfica de los valores de CMI obtenidos se tomó en todos los casos el peor resultado de los ensayos realizados -siguiendo el criterio microbiológico habitual para la elección de la CMI de los AMB-, si bien la mayoría de cepas mostró la misma CMI en los tres ensayos. Como se aprecia en la **Figura 15a**, encontramos cepas de *S. Typhimurium* con una susceptibilidad notablemente inferior a la mayoría de AE probados (canela, orégano, tomillo rojo y tomillo común) (cepas nº 1 y 2). Para confirmar el comportamiento de estas cepas y descartar una sobreestimación de su “resistencia” (en caso de que el valor tomado hubiese sido muy superior al de los otros dos ensayos), se compararon todos los resultados obtenidos con las cepas 1 y 2 y la cepa de referencia (CR), con una susceptibilidad media, confirmando las diferencias observadas inicialmente (**Figura 15b**). En el caso de *S. Enteritidis*, el comportamiento de las cepas con los AE fue muy similar (**Figura 16**).

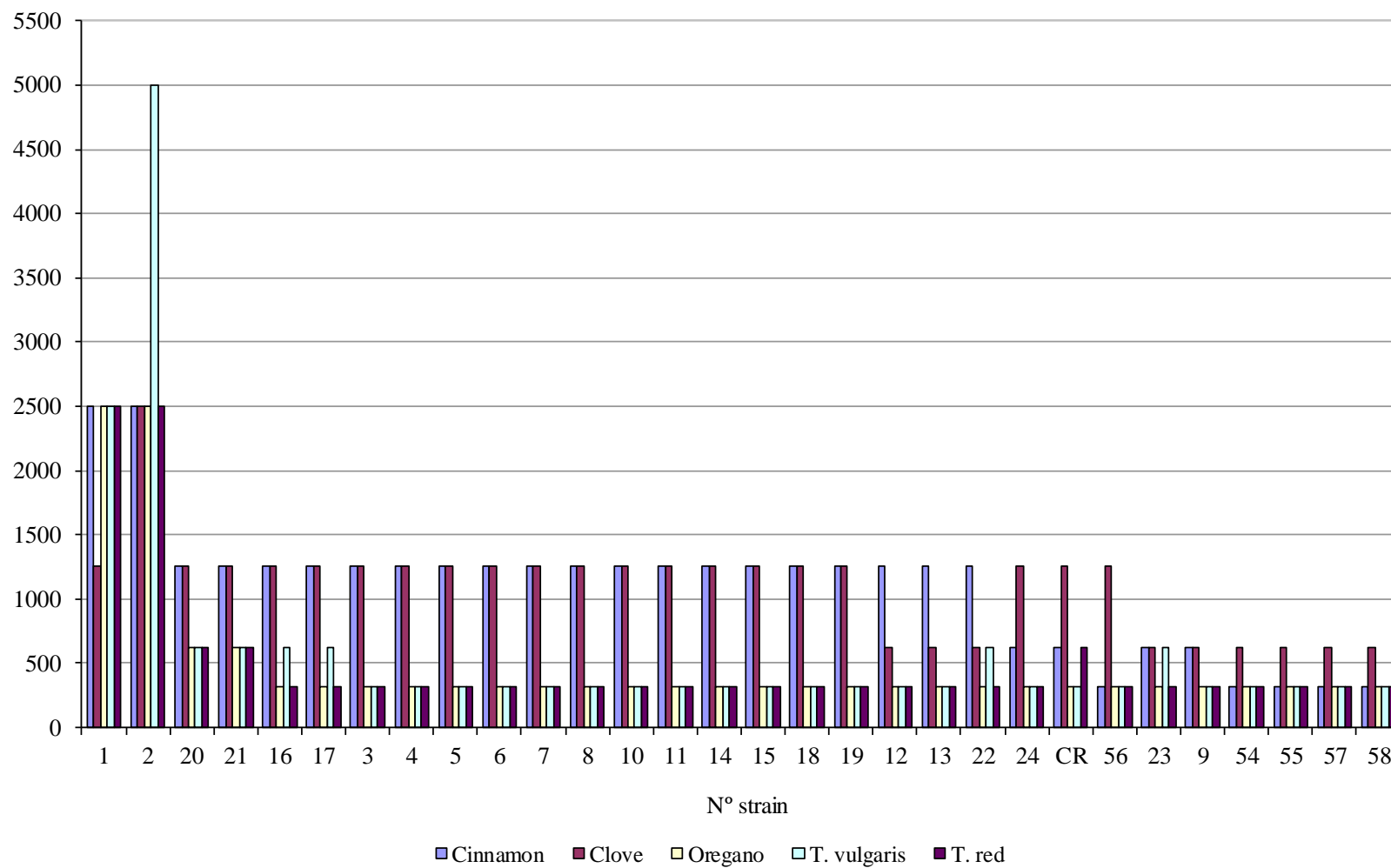


Figura 15a. Distribución de las CMI ($\mu\text{g/mL}$) estimadas para las 30 cepas de *S. Typhimurium* frente a los cinco aceites esenciales probados

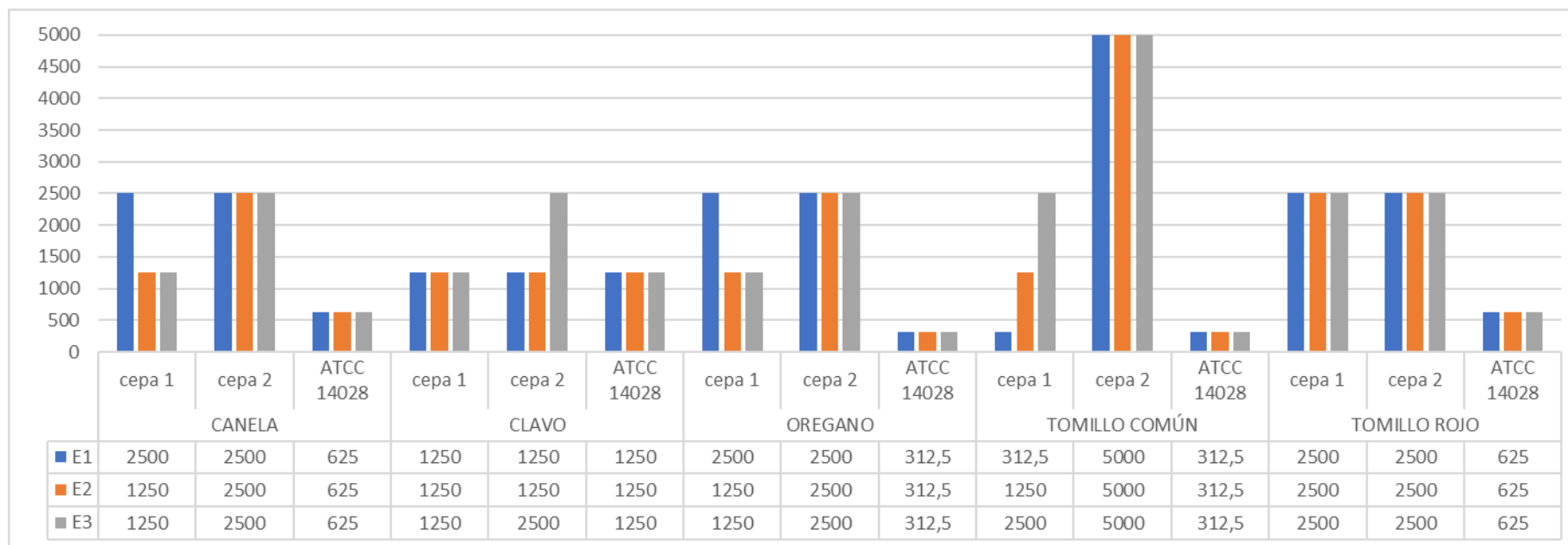


Figura 15 b. Detalle de la distribución de la CMI para las cepas 1 y 2 (con posible perfil de resistencia) y la cepa de referencia ATCC 14028.

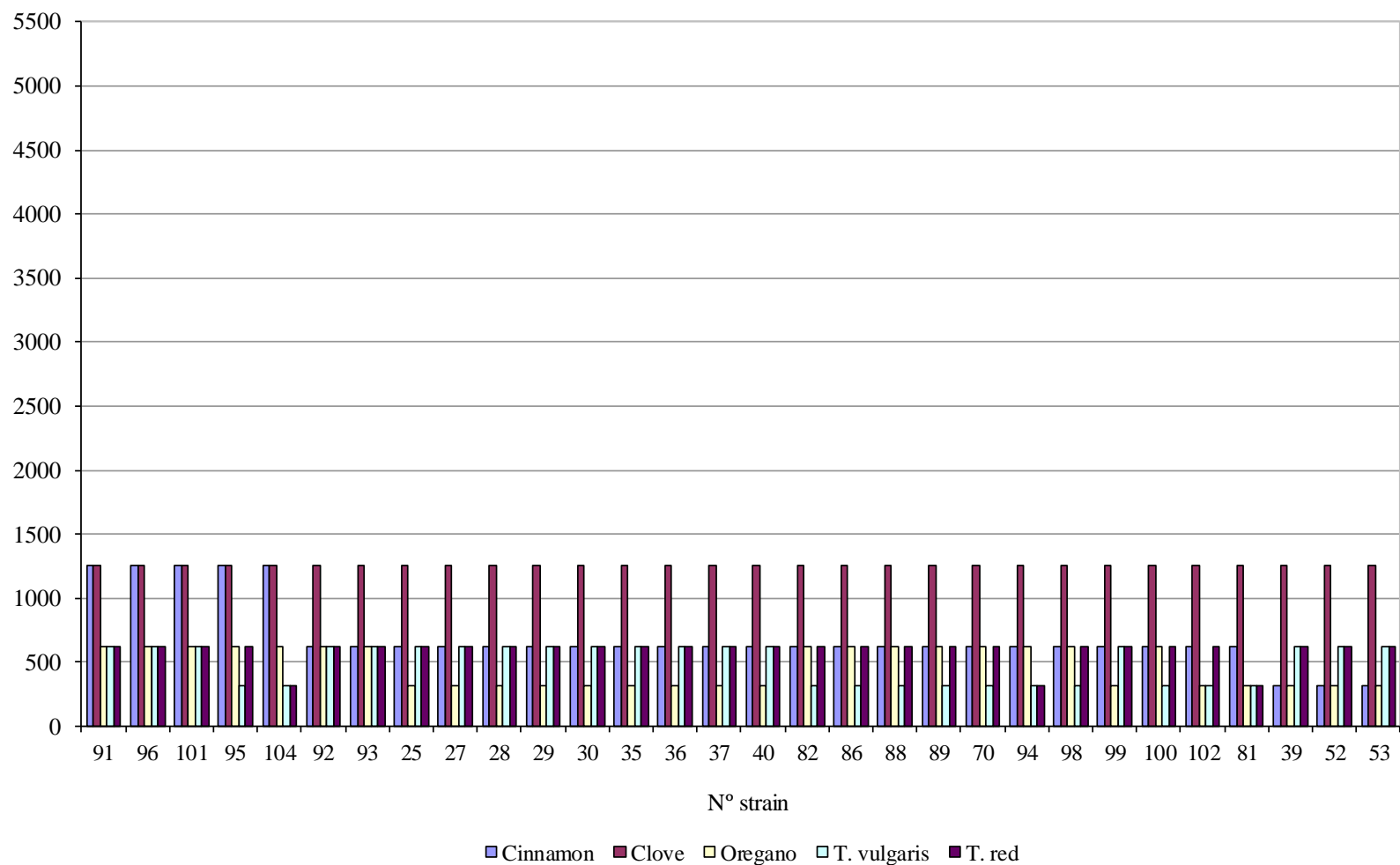


Figura 16. Distribución de las CMI ($\mu\text{g/mL}$) estimadas para las 30 cepas de *S. Enteritidis* frente a los cinco aceites esenciales probados.

DISCUSIÓN

Los AE de orégano, tomillo, canela y clavo han destacado por su actividad antimicrobiana frente a numerosos patógenos que afectan al hombre y a los animales (Becerril et al., 2012; Fonseca et al., 2015; Sarac & Ugur, 2008; Vetvicka & Vetvickova, 2016). Sin embargo, en la mayoría de países industrializados su uso sólo está autorizado como aditivo alimentario y su reconocimiento como antimicrobianos precisaría de una estandarización de las pautas de administración y un mayor conocimiento de sus efectos *in vivo* (Becerril et al., 2012; Mith et al., 2014; Randall et al., 2016; Silva et al., 2013). El principal problema que encontramos es el amplio rango de valores que describen los trabajos *in vitro* para la CMI de un mismo AE y especie bacteriana, así como la limitación de la mayoría de estudios a un número muy reducido de cepas y serotipos, lo que condiciona su validez interna y externa (Franz et al., 2010; Rota et al., 2004). Encontramos, además, que la CMI y la CMB estimadas en estos trabajos, expresadas habitualmente como la media de los valores hallados para el total de cepas, podrían subestimar la dosis clínica precisa para controlar una infección bacteriana (Langeveld et al., 2014; Schwarz et al., 2010).

El presente estudio, realizado con una amplia gama de serotipos de *S. enterica* implicados en sanidad animal y salud pública, confirmó el potencial antimicrobiano descrito en la bibliografía para los AE ensayados y aporta nuevos datos sobre la distribución de la susceptibilidad de esta especie bacteriana (Bajpai et al., 2012; Becerril et al., 2012; Da Silva et al., 2016). Los valores estimados para la CMI₉₀ y la CMB₉₀ destacaron especialmente la actividad antimicrobiana del orégano, tomillo rojo y tomillo común, sobre clavo y canela, resultados que

coinciden con el potencial descrito por otros autores para estos AE y los estudios bioquímicos que atribuyen mayor potencial antimicrobiano a los AE con un alto porcentaje de terpenoides (Nazzaro et al., 2013). En el caso del orégano y el tomillo esta actividad se basa en la disrupción de la membrana citoplasmática, con aumento de su permeabilidad, la fuga de potasio y carboxifluoresceína al espacio extracelular, y un aumento del ATP extracelular que altera su capacidad para mantener el gradiente de pH, llevar a cabo reacciones REDOX y varios procesos enzimáticos (Nazzaro et al., 2013; O'Bryan et al., 2015).

Destacar, sin embargo, que la CMI₉₀ y la CMB₉₀ estimadas en nuestro trabajo distaron bastante de los valores medios descritos en los trabajos previos, siendo en unos casos superiores y en otros inferiores a estos parámetros. Como ejemplo, para los AE de orégano y tomillo algunos autores refieren una CMI media para *Salmonella* de 66,7 µg/mL, mientras que otros hallaron valores de hasta 10000 y 20000 µg/mL (Hammer et al., 1999; Mith et al., 2014; Peñalver et al., 2005; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010). Si bien esta diferencia entre estudios suele ser atribuida a variaciones en la composición química de un mismo AE en función de la especie botánica o el método de extracción (Franz et al., 2010; Rota et al., 2004), consideramos que la diferencia observada podría estar más bien asociada al tamaño de la muestra y a variaciones en la susceptibilidad de las cepas estudiadas; factor que ha sido sugerido en investigaciones previas con diferentes serotipos y cepas de *Salmonella* (Gutiérrez et al., 2006; Peñalver et al., 2005; Solarte, 2016). Como se aprecia en el estudio comparativo realizado en esta Tesis entre los serotipos Typhimurium y Enteritidis se detectaron diferencias significativas en su susceptibilidad a los AE de clavo y canela.

En el caso de *S. Typhimurium* encontramos, además, cepas con valores de CMI superiores al rango usual de valores obtenidos para cuatro de los AE estudiados, sugiriendo un posible perfil de multirresistencia a los AE y proponiendo la denominación MEOR (Multiple Essential Oil Resistance) por sus siglas en inglés. Esta variabilidad a nivel de serotipo y cepa se describe de forma rutinaria para los antimicrobianos, justificando los programas de Vigilancia Microbiológica y las pruebas rutinarias *in vitro* para establecer los tratamientos (EFSA & ECDC, 2015; 2016).

La susceptibilidad reducida de estas cepas contrastó notablemente con la susceptibilidad de la cepa de referencia de *S. Typhimurium* ATCC14028, sobre todo para los AE de clavo y canela. Las CMI obtenidas para esta cepa fueron muy similares a las descritas en otros estudios (Luz et al., 2012; 2014; Solarte et al., 2017) encontrándose, sin embargo, por debajo del valor estimado para la CMI₉₀, por lo que consideramos que los ensayos limitados a un serotipo o cepa no aportarían una visión completa del potencial de estas sustancias y/o la susceptibilidad de las diferentes poblaciones bacterianas.

Por último, debemos señalar que si bien la concentración precisa para inhibir el crecimiento del 90% de las cepas de *S. enterica* estudiadas superaría en todos los casos el límite de citotoxicidad (500 µg/mL) establecido por Dušan et al. (2006) para las células intestinales, la capacidad regenerativa de este epitelio repararía de forma natural el aumento de la apoptosis inducida por los AE. Asimismo, considerando el método seguido para realizar los ensayos *in vitro*, basado en diluciones dobles seriadas del AE, sería preciso ampliar el ensayo con

diluciones entre 312,5 a 625 µg/mL a fin de ajustar más la CMI₉₀ con respeto al límite de seguridad.

Por tanto, podemos concluir que, en base a los resultados obtenidos en este estudio, los AE de orégano y tomillo (rojo y común) podrían constituir una alternativa eficaz a los antimicrobianos tradicionales para el control de *Salmonella enterica*, si bien es preciso ampliar los estudios *in vitro* sobre la susceptibilidad de esta bacteria a más cepas clínicas para estimar con mayor precisión la CMI₉₀ y la CMB₉₀ y completarlos con estudios de actividad y toxicidad *in vivo*. Estos parámetros aportarían una información de gran relevancia para la determinación de los puntos de corte de susceptibilidad/resistencia.

Los resultados de este objetivo están siendo considerados para su publicación bajo el título “**Distribution of minimum inhibitory and bactericidal concentrations of several essential oils against *Salmonella enterica* serotypes involved in animal and public health**” en la revista científica *Journal of Medicinal Food* indexada en Journal Citation Reports (JCR), Categoría: Food Science and Technology, Cuartil: Q2, Rango: 47/129, Factor de impacto: 1,955.

CAPÍTULO IV

OBJETIVO 2

Introducción

Material y Métodos

Resultados

Discusión



IV. OBJETIVO 2.

Estudiar el efecto de la combinación de los aceites con los principales antimicrobianos utilizados para el control de la infección por *Salmonella* en los animales.

INTRODUCCIÓN

Por lo general, el control de *Salmonella* spp. en humanos y animales se ha basado en terapias antimicrobianas, especialmente con medicamentos de amplio espectro. Las organizaciones internacionales de salud destacan el uso inapropiado de estos fármacos en animales de granja, como un factor importante para la aparición y propagación de bacterias resistentes con graves consecuencias para la salud pública y la industria alimentaria (FDA, 2013; OIE, 2016). El último informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) sobre la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias zoonóticas, hace hincapié en la amplia difusión de las cepas MDR de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp., sumado a los altos niveles de resistencia a la enrofloxacin, ceftiofur y trimetoprim-sulfametoxazol (EFSA & ECDC, 2015; 2016).

Además, los comités internacionales de expertos han indicado la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Randall et al., 2016). Entre las sustancias estudiadas con mayor potencial se encuentran los AE, extraídos de plantas y especias, autorizados como aditivos alimentarios en animales, para las cuales se han descrito previamente propiedades bactericidas, antiinflamatorias, inmunoestimulantes e incluso anticancerígenas

(Becerril et al., 2012). Entre éstos, los AE de canela, clavo de olor, orégano y tomillo rojo han mostrado una notable actividad contra bacterias Gram positivas (Huerta et al., 2016) y Gram-negativas de interés en salud pública y animal (e.i: *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*). La característica principal de los AE es su composición química compleja y la interacción sinérgica de muchos de sus ingredientes activos. La acción de los AE se desarrolla mediante diversos mecanismos que afectan la supervivencia bacteriana, lo que disminuye la posibilidad de selección de cepas resistentes (Nazzaro et al., 2013).

Langeveld et al. (2014), sugirieron un posible cambio del mecanismo de resistencia bacteriana para los AMB, consistente en la formación de barreras de permeabilidad y/ o bombas de eflujo, como consecuencia de la ruptura de la membrana celular debido a la inhibición de *ATPasa* por acción del cinamaldehído. Otra explicación plausible es que después de entrar en la célula bacteriana, las moléculas vegetales inhibieron las bombas de eflujo responsables de la reducción de la concentración de antibióticos dentro de la célula (Kollanoor-Johny et al., 2010). Recientes estudios probaron el efecto inhibidor del AE de *Salvia* sobre la bomba de eflujo Tet (K) de *Staphylococcus epidermidis* resistentes a la tetraciclina (Chovanová et al., 2015).

Sin embargo, se ha descrito un efecto citotóxico dependiente de la dosis en las células intestinales (Dušan et al., 2006). Los estudios sobre el efecto combinado de AE y AMB resaltan esta combinación como una posible solución al problema de la resistencia antimicrobiana (Liu et al., 2014).

En los últimos años es cada vez más común el uso combinado de AMB con el fin de expandir el espectro de acción, lograr un efecto sinérgico, minimizar la

toxicidad del fármaco y/o disminuir las resistencias bacterianas. Estas combinaciones son utilizadas principalmente para el tratamiento de infecciones múltiples causadas por microorganismos con distinta susceptibilidad antimicrobiana o para casos en los que no puedan utilizarse dosis altas de ciertos antibióticos por los efectos adversos que éstos podrían causar (Miladi et al., 2017).

El uso combinado de AE con actividad antimicrobiana demostrada y los antibióticos tradicionales podría suponer una alternativa eficaz al control de cepas resistentes, que permitiría además reducir la toxicidad y efectos adversos de los fármacos comúnmente usados en sanidad animal.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL DE ESTUDIO

Cepas bacterianas

Para este estudio, se seleccionaron 15 cepas clínicas de *Salmonella enterica*, previamente caracterizadas como MDR (Multiple Drug Resistance, por sus siglas en inglés), del cepario del Departamento de Sanidad Animal (Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España) y del Laboratorio Central Veterinario (Algete, Madrid, España). Cada antimicrobiano fue ensayado frente a 5 cepas. Las cepas seleccionadas se obtuvieron de diferentes especies animales (pollo, pavo, perdiz, caballo y cerdo) y pertenecían a los siguientes serotipos: Typhimurium, Enteritidis, London y Hadar (**Tabla 3**).

Las cepas seleccionadas para desarrollar el presente objetivo han sido utilizadas en estudios previos de nuestro grupo de investigación sobre la susceptibilidad de *Salmonella enterica* a diversos AE.

Todas las cepas ensayadas fueron conservadas hasta su utilización en sistema de criobolas congeladas a -20 °C (Cryobank™, Londres-Reino Unido).

Se incluyeron como controles de calidad las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 procedentes del *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EE.UU.).

Aceites esenciales

Los AE probados fueron los siguientes: canela (*Cinnammomun zeylanicum*), clavo (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo rojo (*Thymus zygis*). Se obtuvieron de la misma casa comercial (Aromium S.L. Barcelona, España). La composición química de éstos AE fue determinada y proporcionada por el fabricante (**Tabla 4**).

Antimicrobianos

Los AMB estudiados fueron: enrofloxacina (pureza de HPLC al 98%), hidroclicloruro de ceftiofur (CEF) (HPLC> 95% de pureza) y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) (pureza HPLC 99,7%), y suministrados por Sigma Aldrich Co. Cada antimicrobiano fue disuelto siguiendo los parámetros establecidos en el ‘*Clinical and Laboratory Standards Institute*’ hasta obtener una solución madre de 1024 µg/mL (CLSI, 2015).

MÉTODOS

Preparación del inóculo bacteriano

El inóculo bacteriano se preparó siguiendo la metodología explicada en el objetivo 1, logrando llegar a una suspensión bacteriana final (inóculo bacteriano) de 5×10^5 UFC/mL.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria Individual (CMI_I) de los AE y los AMB frente a cada cepa estudiada

Siguiendo el método de microdilución en caldo (CLSI, 2015), ampliamente explicado en el primer objetivo de la presente tesis doctoral, se prepararon diluciones dobles seriadas de cada uno de los AE puros y la solución madre de cada AMB en caldo Müller-Hinton (MH): rango de concentración final para AE 10000-78,125 µg/mL y rango de concentración final para AMB 32-0,02625 µg/mL. Utilizando placas microtiter de 96 pocillos, cada dilución de AE y cada dilución de AMB se enfrentó con un volumen igual de inóculo bacteriano hasta llegar a una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. Los ensayos se realizaron por triplicado incluyendo controles de crecimiento positivos (caldo MH sin AE, pero con inóculo bacteriano) y controles negativos (caldo MH sin AE y sin inóculo). Después de la incubación a 37°C durante 16-20 h, se determinó la CMI_I como la concentración más baja de AE o AMB capaz de inhibir el crecimiento visible de las bacterias en los pocillos (**Figura 13**).

Evaluación del efecto combinado de los AE y los AMB

Para determinar el efecto combinado entre los AE y los AMB ensayados en el presente estudio, se utilizó la técnica de Checkerboard (Si et al., 2008). Se

prepararon siete diluciones en serie de cada AMB y once diluciones en serie de cada AE, tal como se realizaron para determinar la CMI, teniendo en cuenta los resultados CMI_I de cada cepa.

Cada pocillo contenía un total de 200 µL: 50µL de dilución de antimicrobiano, 50 µL de dilución de AE y 100 µL del inóculo bacteriano, a excepción de la primera fila y la primera columna en las que se dispensó 100 µL de la dilución del producto correspondiente (AMB o AE) y 100 µL del inóculo bacteriano, usándose ambas como referencia para controlar la actividad de cada agente antimicrobiano de forma individual frente a la cepa bacteriana utilizada (CMI_I). En todas las placas microtiter se reservó un pocillo para el control positivo a partir del cual realizar el recuento en placa y para el control negativo (esterilidad del caldo) se sembraron 100 µL del caldo MH en una placa de agar tripticosa soja (TSA). Todas las placas se incubaron a 37°C por 16-20 horas. Cada ensayo de combinación se realizó por duplicado (**Figura 17**).

			Aceite esencial (µg/mL)											
				D1 2x CMI	D2 1x CMI	D3 0,5x CMI	D4 0,25x CMI	D5 0,125x CMI	D6 0,062x CMI	D7 0,031x CMI	D8 0,015x CMI	D9 0,007x CMI	D10 0,003x CMI	D11 0,001x CMI
			C+		CMI _I									
Antimicrobiano (µg/mL)	D1 2x CMI		CMI _C											
	D2 1x CMI	CMI _I												
	D3 0,5x CMI													
	D4 0,25x CMI													
	D5 0,125x CMI													
	D6 0,062x CMI													
	D7 0,031x CMI													

Figura 17. Método del damero o Checkerboard.

Cálculo de los CIF y sus respectivos índices CIFI

El efecto de la combinación de cada AMB y cada AE se estableció y se expresó mediante el cálculo de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) y el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (CIFI), de acuerdo con la siguiente fórmula (Knezevic et al., 2016):

$$CIF = \frac{CMI \text{ Combinada aceite esencial o agente antimicrobiano}}{CMI \text{ Individual aceite esencial o agente antimicrobiano}}$$

$$CIFI = CIF \text{ de AE} + CIF \text{ del agente AMB}$$

Interpretación de los resultados

Los resultados del ensayo de sinergia se interpretaron mediante el cálculo de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) y sus respectivos índices (CIFI). Este índice se calcula para cada uno de los antimicrobianos ensayados dividiendo la concentración del compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de la cepa en una fila o columna, por la CMI obtenida para ese producto individualmente (CMI_I) en el ensayo de sinergia.

Una vez calculados ambos índices se suman obteniéndose el índice CIF conjunto (Hemaiswarya et al., 2009). De esta forma para cada placa se obtiene normalmente más de un CIFI, tomando como resultado final el valor más bajo, y en caso de obtener el mismo valor varias veces se optó por tomar la combinación con una mayor reducción de la concentración eficaz de antimicrobiano.

$$\frac{[A \text{ pocillo}]}{(CMI_I)_A} + \frac{[B \text{ pocillo}]}{(CMI_I)_B} = CFI_A + CFI_B = CFI$$

La interpretación final del CIFI se realizó en base a los criterios definidos por Basri et al. (2014), recogidos en la siguiente tabla.

Tabla 6. Interpretación de los valores CIFI

Valor CIFI	Interpretación
$\leq 0,5$	Efecto sinérgico total
$> 0,5 < 1$	Efecto sinérgico parcial
$= 1$	Aditividad
$> 1 \leq 4$	Indiferencia
> 4	Antagonismo

Fuente: Basri et al., (2014)

En este sentido el efecto resultante de la combinación de dos antimicrobianos puede ser: (i) *indiferencia*, cuando la actividad de los dos antimicrobianos en combinación no es mayor que la actividad resultante del antibacteriano más efectivo usado en solitario; (ii) *aditividad*, si la actividad de los dos antimicrobianos es igual a la suma del efecto de ambos por separado; (iii) *sinergismo*, cuando la actividad resultante de la combinación de dos antimicrobianos es significativamente mayor que la suma de la actividad de ambos antimicrobianos por separado; (iv) *antagonismo*, cuando el efecto combinado es menor que la de la suma de las sustancias individuales (Knezevic et al., 2016; Basri et al., 2014).

RESULTADOS

Concentración Mínima Inhibitoria Individual (CMI_I)

Las Tablas 7, 8 y 9 muestran las CMI_I obtenidas para cada AE y cada AMB frente a las cinco cepas MDR seleccionadas. Las CMI_I de ENR, CEF y SXT fueron de 2 µg/mL, 4 µg/mL y 8-16 µg/mL, respectivamente. Las CMI_I de los AE de orégano y tomillo rojo osciló entre 312,5-625 µg/mL y la CMI_I de los AE de canela y clavo varió entre 625-1250 µg/mL.

Efecto combinado de los AE con cada antimicrobiano

Los resultados obtenidos mostraron efectos sinérgicos de todos los AMB con, al menos, uno de los AE evaluados (**Tablas 7-9**).

La combinación de SXT con AE de canela mostró un efecto sinérgico total (CIFI <0,5) en 3 de las 5 cepas ensayadas. La combinación de SXT con AE de clavo, en 4 de las 5 cepas ensayadas y el mismo resultado dio la combinación de SXT con AE de orégano. Sin embargo, la combinación de SXT con AE de tomillo rojo condujo a un sinergismo parcial (en 3 de las 5 cepas ensayadas). En la mayoría de los casos, CMI_I de SXT y cada AE resultó en una menor CMI_C al combinarlos dos. El AE de canela mejoró la acción de SXT a una dosis más baja (0,06 µg/mL) en comparación con la SXT utilizada sola (4 µg/mL) frente a *S. Typhimurium* (**Tabla 7**).

En el caso de CEF, en 1 de las 5 cepas ensayadas, su CMI_I se redujo de 8 µg/mL a 0,12 µg/mL cuando se combinó con el AE de canela, y de 8 µg/mL a 0,24 µg/mL cuando se combinó con AE de tomillo rojo. CEF mostró sinergismo con cada AE probado; lo que resulta en un efecto sinérgico total en 2 de las 5 cepas ensayadas cuando se combina CEF con AE de canela, CEF con AE de clavo

y CEF con AE de tomillo rojo. La combinación de CEF con AE de orégano indicó este efecto sinérgico total sólo en 1 de las 5 cepas ensayadas (**Tabla 8**).

Finalmente, ENR mostró efecto sinérgico total con el AE de canela en 3 de las 5 cepas ensayadas (**Figura 18**) y sinergia parcial con AE de clavo (en 1 de las 5 cepas ensayadas) y con AE de orégano (en 3 de las 5 cepas ensayadas). Debe resaltarse que en 5 de las 5 cepas la combinación ENR-canela resultó en una reducción significativa de la CMI_I de ENR (de 2 a 0,03125 $\mu\text{g/mL}$). La combinación de ENR con AE de tomillo rojo tuvo un efecto aditivo o indiferente en todas las cepas ensayadas ($CIFI$ 1,0 – 1,015) (**Tabla 9**).

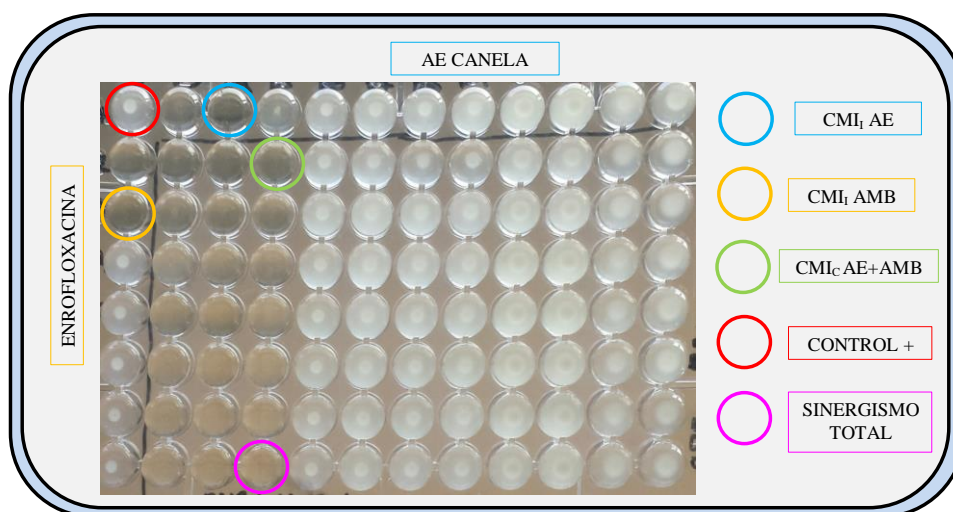


Figura 18. Sinergismo total entre AE de canela y Enrofloxacina

Tabla 7. Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) e índice CIF (CIFI) de las combinaciones entre aceites esenciales y Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT) frente a *Salmonella enterica* resistente a SXT.

Cepas probadas																
		S. Typhimurium 7162/03			S. Typhimurium 168/04			S. Typhimurium 504/04			S. Typhimurium 171/04			S. Typhimurium 590/05		
Combinación		CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF
SXT+ Canela				0,5			0,5			0,265			0,515			1,015
	SXT	4	2	0,5	4	2	0,5	4	0,06	0,015	4	0,06	0,015	4	0,06	0,015
	Canela	625	0,3052	0,0005	1250	0,6103	0,0005	1250	0,6103	0,25	1250	625	0,5	1250	1250	1
SXT+Clavo				0,5			0,5			0,5			0,5			1,015
	SXT	4	2	0,5	4	2	0,5	4	2	0,5	4	2	0,5	4	4	1
	Clavo	625	0,3052	0,0005	625	0,3052	0,0005	1250	0,6103	0,0005	1250	0,6103	0,0005	1250	18,75	0,015
SXT+Orégano				0,5			0,5			0,5			0,5			0,625
	SXT	4	2	0,5	4	2	0,5	4	2	0,5	4	2	0,5	4	2	0,5
	Orégano	312,5	0,1526	0,0005	312,5	0,1526	0,0005	312,5	0,1526	0,0005	312,5	0,1526	0,0005	312,5	39,062	0,125
SXT+Tomillo rojo				0,5			0,515			1,25			0,562			0,75
	SXT	4	2	0,5	4	2	0,5	4	4	1	4	2	0,5	4	2	0,5
	Tomillo rojo	312,5	0,1526	0,0005	312,5	4,8828	0,015	312,5	78,125	0,25	312,5	19,375	0,062	312,5	78,125	0,25

CMI_I: Concentración Mínima Inhibitoria Individual (µg/mL); CMI_C: CMI Combinada (µg/mL)

Efecto sinérgico total: CIFI ≤ 0,5; Sinergismo parcial: CIFI >0,5< 1; Aditividad: CIFI = 1; Indiferencia: CIFI >1≤4; Antagonismo: CIFI > 4.

Tabla 8. Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) e índice CIF (CIFI) de las combinaciones entre aceites esenciales y Ceftiofur (CEF) frente a *Salmonella enterica* resistente a CEF.

Cepas probadas																
		S. Hadar			S. Typhimurium			S. Typhimurium			S. Enteritidis			S. Typhimurium		
		720/03			13/00			397/02			234/98			168/04		
Combinación		CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF
CEF+ Canela				0,75			0,265			0,5			1,0			1,015
	CEF	8	2	0,25	8	0,12	0,015	16	4	0,25	8	8	1	8	8	1
	Canela	625	312,5	0,5	1250	312,5	0,25	1250	312,5	0,25	625	0,3052	0,0005	1250	18,75	0,015
CEF+Clavo				0,625			1,0			0,5			0,5			1,06
	CEF	8	1	0,125	8	8	1	16	4	0,25	8	4	0,5	8	8	1
	Clavo	1250	625	0,5	1250	3,75	0,003	1250	312,5	0,25	1250	0,6103	0,0005	625	39,062	0,06
CEF+Orégano				1,0			1,0			0,5			1,0			1,25
	CEF	8	8	1	8	8	1	16	8	0,5	8	8	1	8	8	1
	Orégano	312,5	0,1526	0,0005	312,5	0,1526	0,0005	312,5	0,1526	0,0005	312,5	0,937	0,003	312,5	78,125	0,25
CEF+Tomillo rojo				0,53			1,0			0,5			0,5			1,0
	CEF	8	0,24	0,03	8	8	1	16	8	0,5	8	4	0,5	8	8	1
	Tomillo rojo	625	312,5	0,5	312,5	0,1526	0,0005	312,5	0,1526	0,0005	625	0,3052	0,0005	312,5	0,1526	0,0005

CMI_I: Concentración Mínima Inhibitoria Individual (µg/mL); CMI_C: CMI Combinada (µg/mL)

Efecto sinérgico total: CIFI ≤ 0,5; Sinergismo parcial: CIFI >0,5 < 1; Aditividad: CIFI = 1; Indiferencia: CIFI >1 ≤ 4; Antagonismo: CIFI > 4.

Tabla 9. Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) e índice CIF (CIFI) de las combinaciones entre aceites esenciales y Enrofloxacin (ENR) frente a *Salmonella enterica* resistente a ENR.

Cepas probadas																
		S. Typhimurium			S. Enteritidis			S. Enteritidis			S. London			S. Enteritidis		
		510/04			251/15			256/00			246/46			248/70		
Combinación		CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF	CMI _I	CMI _C	CIFI CIF
ENR+Canela				0,265			0,265			0,265			0,515			0,515
ENR	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	0,015
Canela	1250	312,5	0,25	625	156,25	0,25	1250	312,5	0,25	625	312,5	0,5	625	312,5	0,5	0,5
ENR+Clavo				0,625			1,015			1,015			1			1,015
ENR	2	0,25	0,125	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	2	1	0,5	2	0,031	0,015	0,015
Clavo	1250	625	0,5	1250	1250	1	1250	1250	1	1250	625	0,5	1250	1250	1	1
ENR+Orégano				0,75			1,015			1,015			0,515			0,515
ENR	2	1	0,5	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	0,015
Orégano	312,5	78,125	0,25	312,5	312,5	1	625	625	1	312,5	156,2	0,5	625	312,5	0,5	0,5
ENR+Tomillo rojo				1			1,0			1,0			1,015			1,015
ENR	2	1	0,5	2	2	1	2	2	1	2	0,031	0,015	2	0,031	0,015	0,015
Tomillo rojo	312,5	156,25	0,5	312,5	0,1526	0,000	625	0,3052	0,0005	625	625	1	625	625	1	1

CMI_I: Concentración Mínima Inhibitoria Individual (µg/mL); CMI_C: CMI Combinada (µg/mL)

Efecto sinérgico total: CIFI ≤ 0,5; Sinergismo parcial: CIFI >0,5 < 1; Aditividad: CIFI = 1; Indiferencia: CIFI >1 ≤ 4; Antagonismo: CIFI > 4.

DISCUSIÓN

La posibilidad de combinar productos naturales con propiedades antimicrobianas demostradas para reducir la selección de cepas resistentes ha centrado el interés de los estudios de sensibilidad en los últimos años. El aumento de la susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* multirresistentes a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol y tetraciclina cuando se combinaron a dosis sub-inhibidoras de cinamaldehído, timol o carvacrol demostró la primera evidencia de su efecto sinérgico (Kollanoor-Johny et al., 2010).

Sin embargo, la mayoría de los estudios se han desarrollado con cepas de origen humano y AMB de poco interés en salud pública. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto *in vitro* de la combinación de los AE de canela, clavo, orégano y tomillo rojo con los principales AMB utilizados para el control de cepas MDR de *S. enterica* de origen animal. Este trabajo de investigación es por tanto una de las primeras investigaciones realizadas en el ámbito de la sanidad animal. El hecho de que las cepas objeto de estudio se hayan aislado de casos clínicos reales diferencian nuestro trabajo de otros estudios en los que sólo se utilizaron cepas de referencia (Knezevic et al., 2016).

Los resultados obtenidos muestran efecto sinérgico entre los cuatro AE y los AMB probados, destacando el elevado porcentaje de sinergias totales obtenido al combinar la SXT con todos los AE ensayados. Sin embargo, la mayor potenciación -reducción de la CMI del AMB se observó en la combinación de ENR con AE de canela (disminución de la CMI en 6 diluciones dobles), frente a la adición e indiferencia de su combinación con AE de tomillo rojo. Los AE con un alto porcentaje de timol y carvacrol (tomillo y orégano) han mostrado generalmente mayor potencial antimicrobiano que los AE con cinamaldehído

(canela) y eugenol (clavo) (Bajpai et al., 2012). Debemos recordar, no obstante, que el potencial antimicrobiano de los AE se ve afectado por múltiples factores, como la especie botánica de extracción y la especie bacteriana de ensayo, y que AE con escasa actividad antimicrobiana han demostrado un importante efecto sinérgico con los AMB (Padalia et al., 2015). Así, algunos autores señalan un potencial similar para AE de canela, tomillo y orégano contra *S. Typhimurium* (Gill & Holley, 2004), lo que podría explicar el efecto sinérgico detectado en nuestro trabajo con AE de canela, e investigaciones realizadas con distintos AE de tomillo y ciprofloxacino han descrito desde la ausencia de sinergia hasta un efecto sinérgico total, debido probablemente a pequeñas diferencias en los componentes activos del AE (Fadli et al., 2011). Estas mismas investigaciones encontraron un efecto sinérgico total ($CIF \leq 0,5$) entre el tomillo y la cefixima (cefalosporina de III generación). Los ensayos realizados en nuestro estudio con ceftiofur mostraron efecto sinérgico con todos los AE frente al menos una de las cepas de *Salmonella* spp. ensayadas, si bien la mayor potenciación se observó en su combinación con AE de canela. Estudios similares con otras enterobacterias (*E. coli*) coincidieron al destacar el sinergismo de las cefalosporinas con el AE de tomillo, pero no detectaron efecto positivo con AE de canela y orégano (Si et al., 2008; Yap et al., 2013).

Los mecanismos por los que se produce la sinergia entre AE y AMB son poco conocidos, si bien las investigaciones preliminares destacan la inhibición por algunos AE o sus principios activos de los mecanismos inespecíficos de expulsión activa de ciertos AMB (Becerril et al., 2012; Papadopoulos et al., 2008). El efecto sinérgico observado se traduce en una disminución de la dosis mínima efectiva en el tratamiento de las infecciones y, por tanto, de los efectos adversos (Yap et al.,

2014). En nuestro estudio de distribución de la susceptibilidad *in vitro* (objetivo 1), el AE de canela requirió concentraciones de 625 a 1250 µg/mL para inhibir el crecimiento de todas las cepas ensayadas, quedando por encima del límite de citotoxicidad (500 µg/mL) (Dušan et al., 2006). La reducción observada cuando se combina con AMB, permitiría por lo tanto utilizar este AE por debajo de dicho límite.

En conclusión, la ausencia de antagonismo en las combinaciones AE-AMB probadas y el notable efecto sinérgico observado con la SXT y la ENR muestran que esta nueva medida terapéutica podría ayudar a controlar las subpoblaciones bacterianas multirresistentes, si bien consideramos necesario ampliar el estudio de su efecto combinado a más cepas clínicas y completarlo con investigaciones sobre los mecanismos que determinan las interacciones sinérgicas y su potencial clínico *in vivo*.

Los resultados de este objetivo han sido publicados bajo el título **“Combination of antimicrobials and essential oils as an alternative for the control of *Salmonella enterica* multiresistant strains related to foodborne disease”** en la revista científica *Foodborne Pathogens and Disease* indexada en el Journal Citation Reports (JCR), Categoría: Food Science and Technology, Cuartil: Q2, Rango: 38/129, Factor de impacto: 2,120. Volume 14, Number 10, 2017. DOI: 10.1089/fpd.2017.2295.

CAPÍTULO V

OBJETIVO 3

Introducción

Material y Métodos

Resultados

Discusión



V. OBJETIVO 3.

Determinar la posible aparición de subpoblaciones de cepas de *Salmonella* spp. mutantes de un solo paso resistentes al aceite esencial de orégano, mediante:

- ✓ Estimación de la Concentración de Prevención de Mutantes (MPC).

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un fenómeno natural asociado a la enorme capacidad de adaptación de estos microorganismos. Además de la resistencia natural o intrínseca, por ausencia del receptor diana, las bacterias pueden desarrollar una resistencia adquirida debida fundamentalmente a mutaciones cromosómicas durante la replicación bacteriana, y en menor medida a la adquisición de genes de resistencia (plásmidos, trasposones e integrones), o la activación de mecanismos de expulsión activa. La aparición de una cepa resistente supone que el uso del antimicrobiano a la dosis habitual, o inferiores, no logra inhibir su crecimiento provocando una presión selectiva positiva sobre la subpoblación bacteriana resistente que conllevará el fracaso terapéutico (Chovanová et al., 2015; Langeveld et al., 2014; Marchetti et al., 2011).

Los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 2 de esta tesis sugieren un notable potencial antimicrobiano para los AE, especialmente de orégano, así como un posible efecto sinérgico al combinarlos con enrofloxacin, ceftiofur y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, muchos autores han observado en la compleja composición química de los AE una ventaja sobre los antibióticos, ya que al desarrollar múltiples mecanismos de acción se dificulta la aparición de la resistencia bacteriana (Langeveld et al., 2014; Nazzaro, 2013; O'Bryan et al.,

2015). Sin embargo, las investigaciones llevadas a cabo por Papadopoulos et al. (2008), y Becerril et al. (2012), mostraron el desarrollo de resistencia en bacterias Gram negativas tras la exposición continuada a los AE de orégano y árbol del té. Estos autores asociaron la resistencia a mecanismos inespecíficos como la bomba de expulsión activa (efflux pump), si bien resaltaron la necesidad de realizar estudios moleculares sobre mecanismos de resistencia específicos. Los primeros estudios realizados en este campo mediante inducción de mutaciones de un solo paso con *Candida* spp. y los AE de clavo y geranio, constataron el crecimiento de cepas con susceptibilidad reducida a concentraciones iguales a la CMI (Budzyńska et al., 2013). Este mecanismo de resistencia es el más habitual en el caso de *Salmonella* spp. frente a las fluoroquinolonas, debido a mutaciones de un ‘solo-paso’ en los genes diana (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*) de la región determinante de resistencia a las quinolonas (*QRDR*) (Abraham et al., 2015; Lee et al., 2017).

Estadísticamente, las mutaciones genéticas suelen ocurrir cada 10^9 - 10^{10} divisiones, por lo que las cepas mutantes resistentes constituyen un porcentaje muy pequeño dentro de la población bacteriana. Sin embargo, estas cepas son capaces de crecer a las dosis habituales de tratamiento, establecidas en base a la CMI con un inóculo estándar de 5×10^5 UFC/mL (Abraham et al., 2015; Dahiya et al., 2014). Diversos autores apoyan la necesidad de establecer los intervalos óptimos de dosificación considerando la Concentración de Prevención de Mutantes (MPC), entendida como la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento tanto de las cepas susceptibles como de las cepas resistentes por mutaciones de primer paso que estarían presentes en infecciones con alta densidad bacteriana (Balaje et al., 2013; Dahiya et al., 2014; Nordqvist et

al., 2016). No obstante, esta concentración podría rebasar los límites de seguridad para el animal, siendo imprescindible su valoración en base a parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (Pasquali & Manfreda, 2007).

Considerando todo ello, el último objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar la posible aparición de cepas de *Salmonella* Typhimurium mutantes de un solo paso resistentes al AE de orégano, mediante la estimación de la concentración de prevención de mutantes (MPC).

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL DE ESTUDIO

Cepas bacterianas

Para el siguiente estudio se utilizó la cepa ATCC 14028 y dos de las cepas clínicas de origen porcino de *S. Typhimurium* utilizadas en los objetivos previos (1 y 2): cepas Ref. N° 54 y Ref. N° 57, sensibles a la enrofloxacin (CMI: 0,0625 µg/mL) y con una CMI al AE de orégano de 312,5 µg/mL.

En la **Tabla 3** (objetivo 1) se ha aportado información adicional sobre el perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas seleccionadas.

Aceite esencial

Se ensayó el AE de orégano (AEO) de origen natural, distribuido por Aromium S.L., Barcelona-España. Sus principales componentes activos, número de registro y detalles de sus propiedades figuran en la **Tabla 4**.

Antibiótico

Se utilizó Enrofloxacin (HPLC 98% de pureza) de Sigma-Aldrich Co. (San Luis, Missouri, USA). La ENR se disolvió siguiendo los parámetros establecidos por el CLSI (2015).

MÉTODOS

El test de inducción y determinación de la MPC se basa en la preparación de un inóculo $\geq 10^9$ UFC/mL, mediante cultivo de la bacteria en caldo durante 24 h (**Figura 19**) (Alemany, 2009) y la valoración de su inhibición, mediante dilución en agar por concentraciones de AEO $\geq 1 \times$ CMI.

Como control de calidad se realizó paralelamente el test con la ENR.

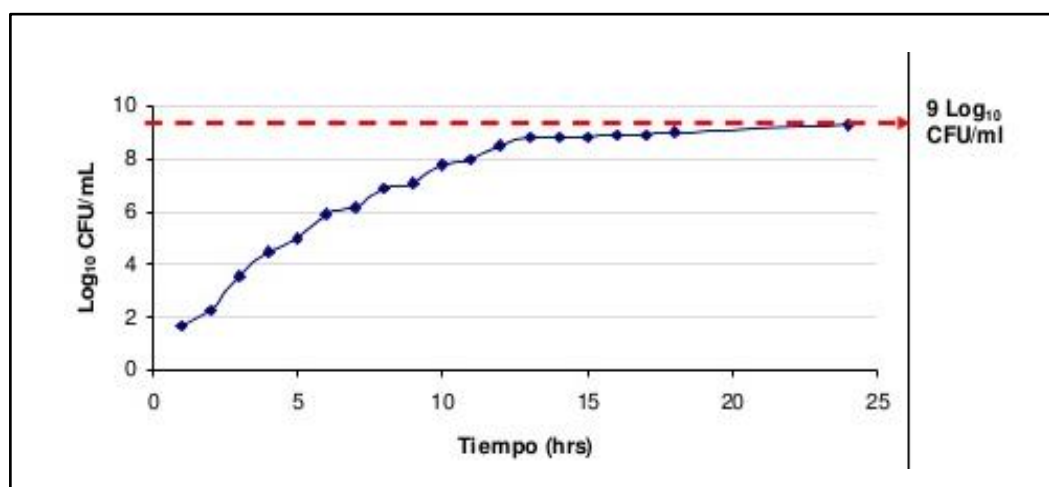


Figura 19. Curva de crecimiento *Salmonella* Typhimurium (Alemany, 2009)

Prueba de viabilidad

Dado que las cepas utilizadas habían sido conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y para garantizar que mantenían un ritmo de crecimiento normal y eran capaces de alcanzar la concentración deseada, se realizó previamente una prueba de

viabilidad inoculando 50 mL de caldo MH con un cultivo puro de TSA y realizando recuento en placa tras incubar durante 24 h a 37 °C (**Figura 20**).

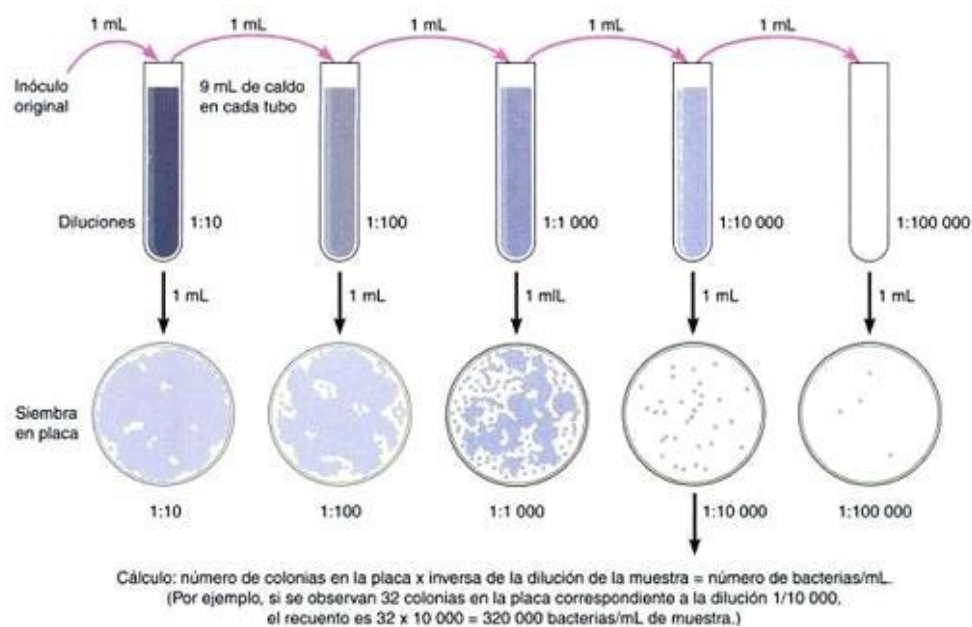


Figura 20. Recuento en placa (Cornellá, 2017)

Determinación de la CMI por dilución en agar

Para determinar las concentraciones finales del AEO y la ENR a utilizar en el test de inducción fue preciso establecer previamente la CMI de cada cepa mediante el método de dilución en agar. Tomando como referencia la CMI establecida para el AEO mediante microdilución en caldo en el objetivo 1 (312,5 µg/mL), se prepararon placas de agar MH conteniendo concentraciones dobles seriadas de AEO entre 78,125 µg/mL y 1250 µg/mL (**Figura 21**). En el caso de la ENR (CMI por microdilución para las 3 cepas de 0,125 µg/mL) la concentración en las placas de agar osciló entre 0,03 µg/mL y 0,5 µg/mL (**Figura 22**).

A partir de un cultivo puro en TSA de 24 horas, se preparó mediante suspensión un inóculo con 10⁸ UFC/mL (escala McFarland 0,5) de cada cepa y se

diluyeron individualmente en solución salina estéril hasta alcanzar una concentración final de 10^7 UFC/mL. A continuación, se depositaron por triplicado 2 µL de cada inóculo sobre la superficie de las placas en el siguiente orden (Figura 21 y 22).

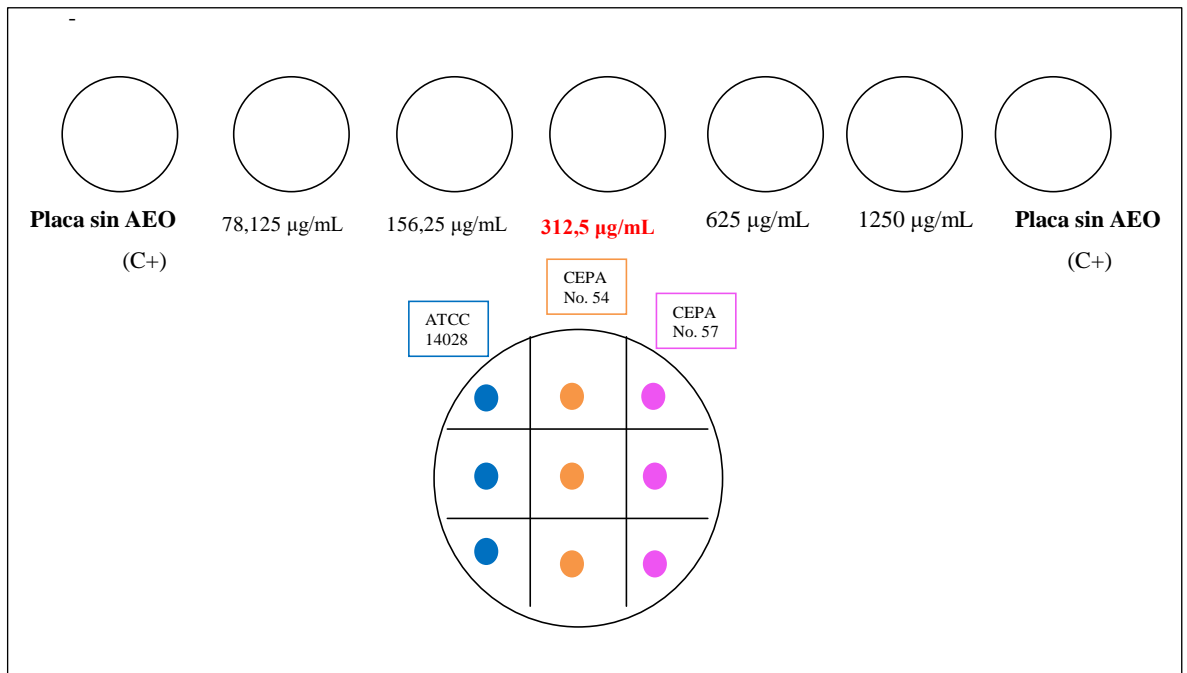


Figura 21. Determinación CMI del AEO por el método de dilución en agar

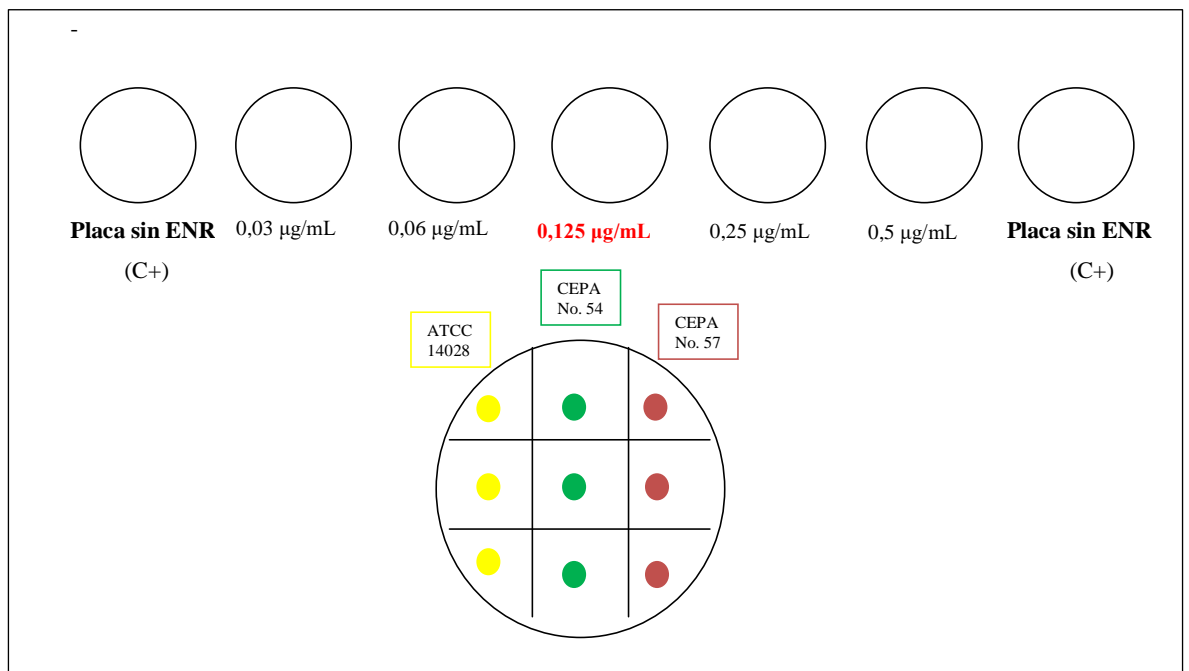


Figura 22. Determinación CMI de la ENR por el método de dilución en agar.

Tras dejar secar las placas a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, se incubaron invertidas durante 24 h a 37 °C. La CMI se determinó como la menor concentración de antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible del microorganismo (**Figura 23**). En caso de discrepancia entre dos o más ensayos se procedió a repetir la prueba.

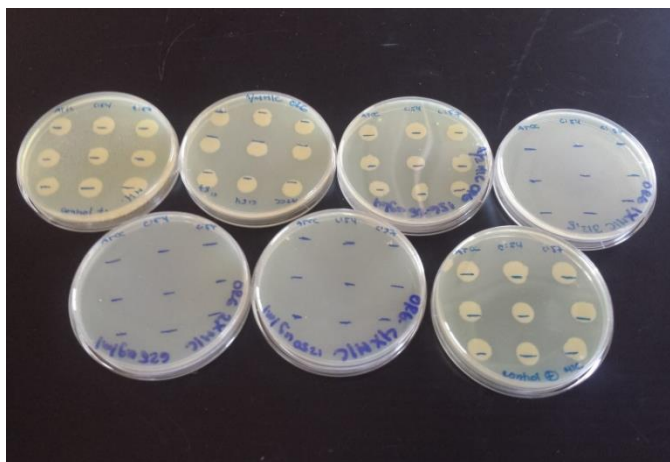


Figura 23. Determinación de CMI del AE de orégano por dilución en agar

Test de inducción de mutaciones y determinación de la MPC

Para obtener la MPC del AEO se prepararon placas de agar MH suplementadas con concentraciones dobles seriadas de aceite entre 1x y 16x veces la CMI, utilizando en total tres placas por concentración. Además, se incluyeron dos placas con AEO a concentraciones $\frac{1}{4}$ x y $\frac{1}{2}$ x CMI como control del comportamiento de la cepa frente al AE.

En el caso de la ENR (utilizada como control de calidad del método), la concentración del antibiótico en las placas fue de $\frac{1}{4}$ x a 64x veces la CMI estimada mediante dilución en agar.

Una vez obtenido el inóculo $\geq 10^9$ de la cepa a estudiar, mediante incubación durante 24 h/37 °C de 50 mL de caldo MH inoculado a partir de un cultivo puro, se sembraron 200 μ L en cada una de las placas de agar suplementadas con ENR o con AEO (**Figura 24**) (Pasquali & Manfreda, 2007; Budzyńska et al., 2013).

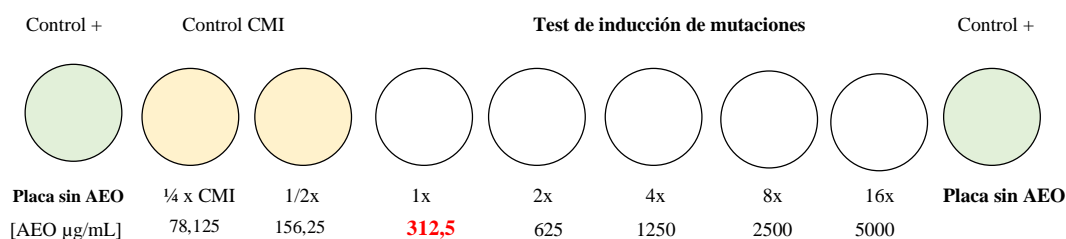


Figura 24. Esquema del test de inducción

Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 2 días, y tras contar las colonias presentes en cada placa se continuó su incubación durante 3 días hasta completar los 5 días de observación. Por último, se seleccionaron las cepas con crecimiento a concentraciones superiores o iguales al valor de la CMI ($\geq 1x$) para su aislamiento y serotipificación mediante los métodos estandarizados para *Salmonella*. Las cepas en cultivo puro se conservaron en criobolas a -20 °C para posteriores análisis. La concentración del inóculo se comprobó en todos los ensayos mediante recuento en placa.

El protocolo del test de inducción habitualmente utilizado para antibióticos, como las fluoroquinolonas (Pasquali & Manfreda, 2007), incluye el estudio molecular para la detección de mutaciones de un solo paso. Esto precisa conocer con detalle los genes diana asociados a la resistencia a dicho antimicrobiano; la región *QRDR* para las fluoroquinolonas. En el caso de los AE, la ausencia de

investigaciones sobre posibles secuencias genéticas relacionadas con la resistencia a los mismos dificulta el estudio molecular de mutaciones de un solo paso.

Considerando lo anterior, en nuestro trabajo sólo fue posible realizar el estudio genético para la detección de mutaciones a las cepas obtenidas en el test de inducción a la ENR.

Estudio molecular de mutaciones de un solo paso asociadas a resistencia a la ENR

Todas las cepas originales (sensibles a la ENR) y las cepas de susceptibilidad reducida obtenidas en el test de inducción con este antimicrobiano se sometieron a estudio molecular para detectar posibles mutaciones en los genes diana de la región *QRDR*.

Aislamiento del ADN

Para la extracción del ADN, se siguió el método descrito por Ruiz-Barba et al. (2005), con las siguientes modificaciones: se eliminaron las colonias individuales que crecían en medios sólidos con una punta de plástico estéril y se resuspendieron en 100 µL de agua desionizada estéril en un tubo de microcentrífuga. A continuación se añadieron 100 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24: 1) a las suspensiones y después se agitó con Vortex durante 5 segundos. La mezcla se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos. Luego se utilizaron 2,5-5 µL de la fase acuosa superior como una fuente de plantilla de ADN para las diferentes aplicaciones de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Las extracciones de ADN genómico se cuantificaron usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

Amplificación por PCR y secuenciación de ADN de la región QRDR

Con el ADN aislado y purificado, se realizó la PCR para la región *QRDR* de todas las subunidades de DNA girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (genes *parC* y *parE*) de las cepas originales y mutantes representativas de un solo paso usando la técnica descrita por Dahiya et al., (2014). Los cebadores forward (FW) y reverse (RV) (Eurofins Genomics) utilizados para cada gen fueron los siguientes:

- ✓ *gyrA*, FW: 5'-ATGAGCGACCTTGCGAGAGAAATTACACCG-3' and RV: 5'-TTCCATCAGCCCTTCAATGCTGATGTCTTC-3';
- ✓ *gyrB*, FW: 5'-GCGCTGTCCGAACTGTACCT-3' and RV: 5'-TGATCAGCGTCGCCACTTCC-3';
- ✓ *parC*, FW: 5'- ATGAGCGATATGGCAGAGCG-3' and RV: 5'-TGACCGAGTTCGCTTAACAG-3';
- ✓ *parE* FW: 5'-TCTCTTCCGATGAAGTGCTG-3' and RV: 5'-ATACGGTATAGCGGCGGTAG-3'.

Las condiciones de PCR consistieron en 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos para *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*; alineamiento a 70 °C durante 60 segundos para *gyrA*, 63 °C durante 60 segundos para *gyrB*, 56 °C durante 60 segundos para *parC* y 64 °C durante 60 segundos para *parE*; y la fase de extensión a 72 °C durante 90 segundos para *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*.

Después de las reacciones de PCR, los cebadores y nucleótidos libres se eliminaron mediante precipitación con Etanol / acetato sódico y el ADN se

resuspendió en 10 µL de agua miliq. La secuenciación de nucleótidos fue realizada por el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba (España) con los cebadores listados, utilizando la química de colorantes ABI Big-Dye 3.1 y ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Se obtuvieron secuencias para todos los *QRDR* (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*) de (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) usando la secuencia de la cepa LT2 de *S. Typhi* (Nº de acceso NC-003197.2) como referencia. Los archivos de cromatografía de secuencias se analizaron usando Sequencing Analysis v.5.2.0 para resolver las ambigüedades de los nucleótidos. El análisis de secuencias y la alineación global de las secuencias se realizaron utilizando los siguientes programas:

- ✓ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).
- ✓ CLUSTALW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>).



Figura 25. PCR *gen gyrA*

Determinación de la CMI de las cepas obtenidas en el test de inducción

A todas las cepas “mutantes”, con susceptibilidad reducida, obtenidas en los test de inducción con AEO y ENR se les determinó la CMI del producto correspondiente mediante los métodos de microdilución en caldo y dilución en agar, siguiendo los protocolos previamente descritos.

RESULTADOS

Las tres cepas de *S. Typhimurium* utilizadas en este estudio se seleccionaron en base a los resultados del objetivo 1, primero, por su sensibilidad al AEO (CMI microdilución 312,5 µg/mL), y segundo, por su sensibilidad a la ENR (CMI microdilución de 0,0625 µg/mL). Como se muestra en la **Figura 26**, los valores de CMI obtenidos mediante el método de dilución en agar, realizado previamente al diseño de este ensayo, confirmaron estos resultados.

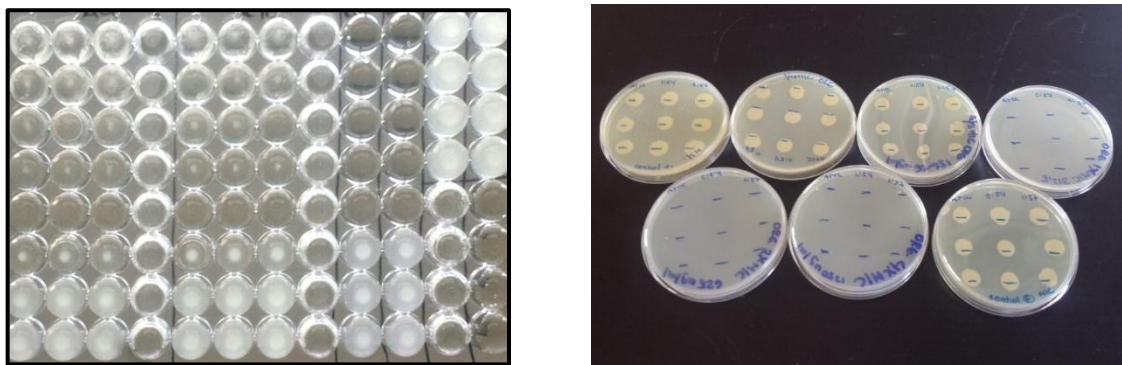


Figura 26. *Determinación de la CMI del AEO mediante los métodos de microdilución en caldo y dilución en agar*

Tras permitir su multiplicación hasta una concentración $\geq 10^9$ UFC/mL, dos de las cepas (ATCC 14028 y N° 54) dieron lugar en el test de inducción con AEO al crecimiento de colonias en la placa de agar con una concentración de aceite igual a la CMI (1x), pudiendo tratarse de cepas con susceptibilidad reducida, asociada o no, a mutación. De esta forma, la concentración necesaria para prevenir el crecimiento total de la población bacteriana (MPC) fue 2x CMI (625 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 27 y Tabla 10**).

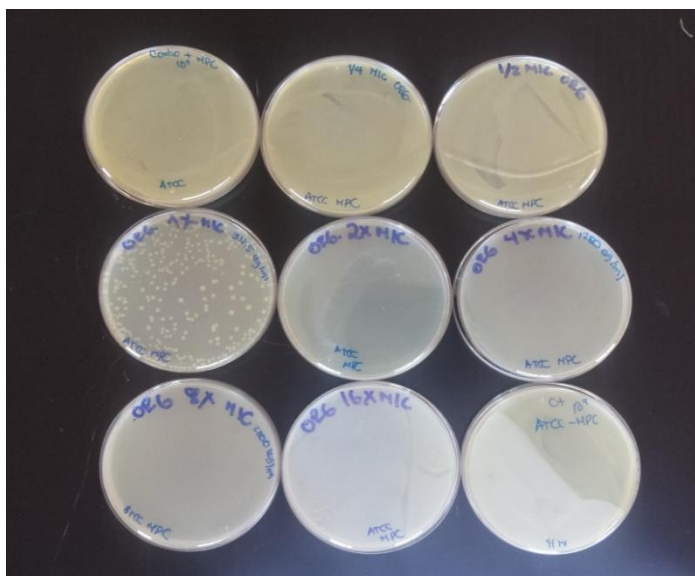


Figura 27. Determinación de la MPC del AEO (ATCC 14028)

Por otra parte, a cepa N° 57 sólo mostró crecimiento a concentraciones inferiores a la CMI (**Figura 28**).

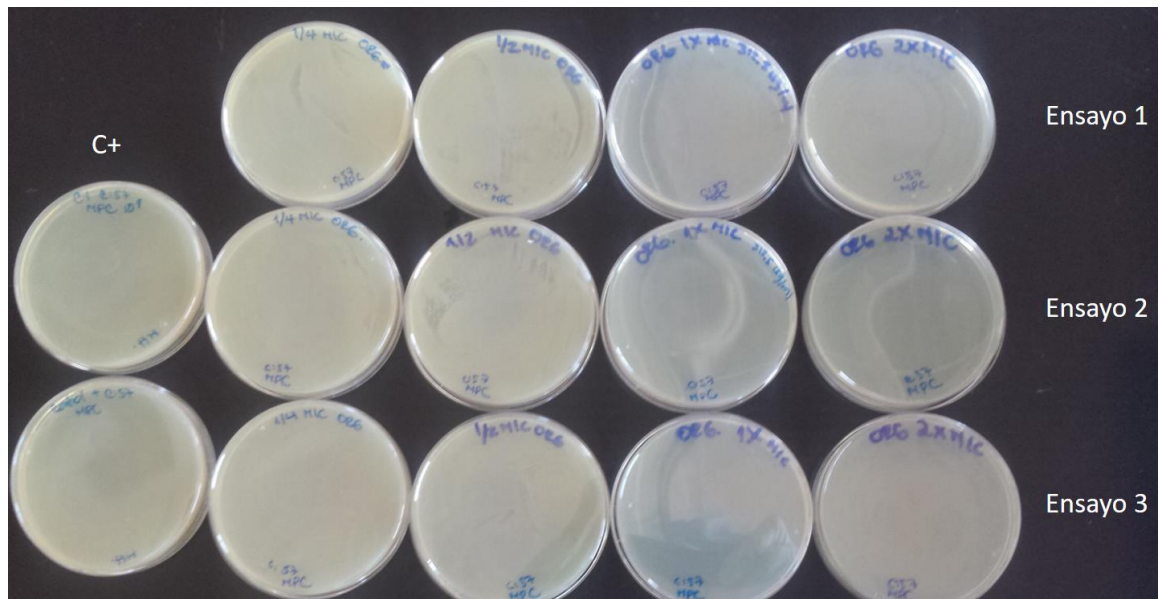


Figura 28. Determinación de la MPC del AEO. Ceba 57

Una vez aisladas e identificadas como *S. Typhimurium*, se determinó la CMI frente al AEO de todas las cepas obtenidas en el test de inducción para valorar una posible reducción de la susceptibilidad. El resultado obtenido para ambas cepas (312,5 $\mu\text{g/mL}$) coincidió con la CMI de las cepas originales (**Tabla 10**).

Tabla 10. CMI, MPC e índice MPC/CMI de las cepas originales y del test de inducción frente al AEO.

Cepas <i>S. Typhimurium</i>	Cepas seleccionadas con crecimiento \geq CMI	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	MPC ($\mu\text{g/mL}$)	MPC/ CMI
Test de inducción				
<i>Cepas Originales</i>				
ATCC 14028	1	312,5	625	2
Cepa N° 54	1	312,5	625	2
Cepa N° 57	0	312,5	-	-
Ensayo de microdilución en caldo				
<i>Cepas del Test inducción</i>				
ATCC 14028 1x CMI	-	312,5	-	-
Cepa N° 54 1x CMI	-	312,5	-	-

Paralelamente al ensayo con AEO se realizó, como control de calidad, el test de inducción con ENR. Las tres cepas mostraron crecimiento en las placas de agar 1x y 2x la CMI, observándose una disminución en el número de colonias a medida que la concentración de antibiótico aumentaba y estableciendo la MPC en 4x la CMI. En la prueba de susceptibilidad *in vitro* a la ENR, las cepas sub-MPC mostraron en todos los casos valores de CMI superiores (0,125-0,25 $\mu\text{g/mL}$) a los de las cepas sensibles originales (0,0625 $\mu\text{g/mL}$), indicando una reducción de la sensibilidad a este antibiótico si bien en ningún caso se alcanzó el punto de corte de resistencia a la ENR establecido por el CLSI (2015), ($\geq 2 \mu\text{g/mL}$) (**Tabla 11**).

Tabla 11. CMI, MPC e índice MPC/CMI de las cepas ensayadas frente a la ENR.

Cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium	Número de cepas seleccionadas	CMI (µg/mL)	MPC (µg/mL)	MPC/CMI	<i>QRDR</i> Mutaciones Genes			
					<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>

Test de inducción

Cepas originales

ATCC14028	2	0,0625	0,25	4	wt	wt	wt	wt
Cepa N° 54	2	0,0625	0,25	4	wt	wt	wt	wt
Cepa N° 57	2	0,0625	0,25	4	wt	wt	wt	wt

Ensayo microdilución en caldo

*Cepas del test de inducción**

ATCC14028 M1	-	0,125	-	-	wt	wt	wt	wt
Cepa N° 54 M1	-	0,125	-	-	wt	wt	wt	wt
Cepa N° 57 M1	-	0,125	-	-	wt	wt	wt	wt
Cepa N° 57 M2	-	0,25	-	-	wt	wt	wt	wt

*M1: cepas con crecimiento en placas 1x CMI de la ENR; M2: cepas con crecimiento en placas 2x CMI de la ENR; wt (wild type): tipo-salvaje.

Finalmente, se procedió al estudio molecular de las cepas originales y las cepas obtenidas en el test de inducción a fin de detectar posibles mutaciones de un solo paso. La caracterización de la región *QRDR* mostró en todos los casos el tipo salvaje (wt) de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, descartando la presencia de mutaciones.

DISCUSIÓN

Los ensayos *in vitro* basados en la determinación de la CMI frente a inóculos bacterianos estandarizados (10^5 UFC/mL) han sido durante décadas la base de los test de susceptibilidad, así como la guía para el manejo de las infecciones. Sin embargo, la correlación entre la susceptibilidad *in vitro* y los resultados clínicos no siempre es del 100%, como consecuencia de la acción de otros factores incluidos la respuesta inmune del huésped y la posible presencia de subpoblaciones bacterianas resistentes (Blondeau, 2009). En este sentido, muchos autores destacan la dificultad observada para controlar infecciones graves, con una alta densidad bacteriana, debido probablemente al desarrollo de mutaciones en el genoma bacteriano durante su replicación, y proponen la determinación de la Concentración de Prevención de Mutantes (MPC) como nueva medida *in vitro* para completar los estudios de susceptibilidad (Blondeau, 2009; Dahiya et al., 2014; Nordqvist et al., 2016). El antibiótico de elección sería, por tanto, aquel capaz de mantener en el tejido diana una concentración igual o superior a la MPC durante el tiempo suficiente para actuar contra las subpoblaciones sensibles y resistentes, sin superar en ningún caso la dosis tóxica para el organismo (Balaje et al., 2013; Pasquali & Manfreda, 2007).

El estudio realizado en este tercer objetivo para valorar una posible resistencia al AEO, como consecuencia de mutaciones de un solo paso, determinó que la MPC de las cepas ensayadas resultó ser el doble de la CMI. Estos resultados, similares a los descritos por Budzyńska et al. (2013) con *Candida* spp. y los AE de clavo y geranio, parecen sugerir una posible reducción en la susceptibilidad de las cepas a los AE. Sin embargo, los valores de CMI obtenidos en la prueba de susceptibilidad realizada en nuestro trabajo a las cepas del test de

inducción fueron iguales a los de las cepas originales, descartando *a priori* el desarrollo de resistencia por mutación al AEO. Otras investigaciones en este campo han sugerido la implicación de mecanismos generales de resistencia como la bomba efflux. Los trabajos de Papadopoulos et al. (2008), con el aceite de árbol de té y sus principales componentes demostraron una reducción en la susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* al bloquear o modificar genéticamente el sistema multidroga de expulsión activa MexAB-OprM. Estos hallazgos estaban basados en un incremento de al menos 4 veces en la CMI de las cepas modificadas con respecto a las cepas salvajes.

Para el desarrollo de este objetivo se utilizó como control de calidad la ENR. Las fluoroquinolonas son una de las clases de antimicrobianos más utilizadas hoy día en medicina humana y animal debido a su espectro y a sus propiedades fisicoquímicas. El uso de quinolonas en veterinaria es considerado un asunto de especial preocupación en salud pública (EFSA & ECDC, 2015; FDA, 2013; OIE, 2008), ya que podría contribuir a la adquisición de resistencia en bacterias transmitidas por alimentos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli*, lo que, a su vez, podría conducir a una reducción de la eficacia del tratamiento de estas infecciones en los seres humanos.

Los resultados obtenidos mostraron una reducción en la susceptibilidad de las cepas salvajes (*wt*), con crecimiento a concentraciones 1x y 2x CMI y una MPC de 4 veces este valor, si bien, en ninguno de los casos las cepas resultantes de la inducción pudieron considerarse resistentes al quedar la concentración efectiva por debajo del punto de corte (0,25 µg/mL). Resultados similares han sido descritos por Pasquali & Manfreda (2007) y Randall et al. (2004), que refieren un incremento en la concentración efectiva de la ENR de entre 4-64 veces

la CMI de las cepas salvajes; concentraciones que resultaron tanto inferiores como superiores al punto de corte (0,5-4 µg/mL). Al igual que en estos trabajos, el estudio molecular de las cepas con susceptibilidad reducida no mostró mutaciones en la región *QRDR*. Si bien, la aparición de mutaciones en los genes *diana* es considerado el principal mecanismo de resistencia de *Salmonella* spp. frente a las fluoroquinolonas, la dificultad observada para inducir su aparición confiere cada vez más relevancia a los mecanismos activos (Pasquali & Manfreda, 2007).

La inducción de la expresión del mecanismo de expulsión activa (efflux pump) como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de antimicrobiano referida en otras investigaciones (Marchetti et al., 2011; Pasquali & Manfreda, 2007) podría explicar la reducción observada en nuestro trabajo en la susceptibilidad de las cepas resultantes de la inducción. Este mecanismo por sí solo tiene un efecto limitado sobre la resistencia (incremento de la CMI de 1-8 veces), si bien se considera que estas bacterias sobrevivirán mejor a la presión de los antimicrobianos y podrían desarrollar posteriores mutaciones genéticas (Becerra et al., 2009; Marchetti et al., 2011; Rodríguez-Martínez, 2007).

Numerosos autores destacan la importancia de los sistemas multidroga de expulsión activa en la aparición de multirresistencia, y en el caso de las fluoroquinolonas, se ha descrito además un efecto sinérgico con las mutaciones genéticas que implicaría altos niveles de resistencia (Marchetti et al., 2011; Rodríguez-Martínez, 2007).

En conclusión, los resultados de este estudio apoyan la necesidad de considerar nuevos parámetros como la MPC en la determinación de las pautas de dosificación para la ENR, y la posibilidad de utilizar el AEO, frente al cual las

cepas mantuvieron su susceptibilidad, como una alternativa eficaz a las fluoroquinolonas en el control de la Salmonelosis.

Los resultados de este objetivo están siendo considerados para su publicación bajo el título “**Induction of resistant mutants of *Salmonella* Typhimurium under enrofloxacin selected pressure and their control with essential oils**” en la revista científica *Microbial Drug Resistance* indexada en Journal Citation Reports (JCR), Categoría: Microbiology, Cuartil: Q3, Rango: 69/125, Factor de impacto: 2,306.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL



VI. DISCUSIÓN GENERAL

En el año 2003, la Unión Europea alertaba del incremento de las resistencias bacterianas, asociado al uso indiscriminado de los antimicrobianos, como un problema grave de salud pública (Reglamento 1831/2003/CE). Debido al carácter zoonótico de la mayoría de procesos contagiosos que afectan al hombre, los animales constituyen un importante reservorio de bacterias resistentes. Los últimos informes publicados por los organismos internacionales de prevención, control de enfermedades y de seguridad alimentaria han destacado el alto nivel de resistencia a antimicrobianos de uso común en humanos y animales, así como la gran difusión de cepas MDR por toda Europa (EFSA & ECDC, 2016).

Los AE, utilizados por el hombre durante milenios de forma empírica, comenzaron a estudiarse como una posible alternativa para el control de las infecciones por bacterias multirresistentes.

Durante los primeros años se multiplicaron los ensayos para valorar la actividad antimicrobiana de un gran número de AE frente a un amplio espectro de microorganismos patógenos, utilizando métodos no estandarizados, lo que complicó enormemente la comparación de resultados. En ese momento, los trabajos de nuestro grupo de investigación ya destacaron el notable potencial de los AE de canela, clavo, orégano y tomillo frente a las Enterobacterias (Gutiérrez 2006; Huerta et al., 2004; 2005). Desde entonces, la mayoría de estudios que se han publicado se han limitado a determinar la CMI, y más raramente la CMB, frente a cepas de referencia y/o un número reducido de cepas clínicas (Burt et al., 2005; Doran et al., 2009; Luz et al., 2012; Peñalver et al., 2005). Los datos obtenidos en esta tesis sobre la distribución de la susceptibilidad de cepas clínicas

de *Salmonella entérica* aportan, por tanto, una información de gran relevancia sobre la CIM₉₀ y la CMB₉₀, con variaciones significativas con respecto a los valores medios descritos en los trabajos previos (De Oliveira et al., 2013; Luz et al., 2012). Nuestro estudio *in vitro* comprobó asimismo el carácter bactericida de los AE probados y demostró diferencias significativas en la susceptibilidad de los serotipos Typhimurium y Enteritidis a los AE de canela y clavo, así como la existencia de cepas con un posible perfil de multirresistencia a los AE.

Somos conscientes, sin embargo, del escepticismo que todavía existe en el mundo científico y profesional hacia los AE, y aunque su uso en el pienso animal está bastante generalizado, consideramos difícil que sustituyan a los AMB. Es por ello que numerosos autores han continuado sus investigaciones valorando el efecto combinado de estas sustancias naturales con los antimicrobianos tradicionales como una opción eficaz para reducir la resistencia bacteriana y las dosis de administración (Bassole et al., 2012; Da Silva et al., 2016; Yap et al., 2014). Como describimos en el segundo objetivo de nuestra tesis, los AE estudiados presentaron efecto sinérgico con los principales AMB de uso común frente a *Salmonella* (SXT, CEF y ENR), logrando una reducción de la concentración efectiva del AMB de hasta 66 veces su CMI individual. Estos resultados coinciden con los hallados por otros autores, y apoyan la necesidad de ampliar estos ensayos a más cepas clínicas y profundizar en los mecanismos de acción de estas sinergias (Da Silva et al., 2016; Lv et al., 2011; Solarte et al., 2017).

La aprobación final de los AE como fármacos requerirá, entre otros, estudios adicionales sobre sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, efectos *in vivo* y posible aparición de tolerancia y resistencia. Los trabajos en este

último campo han demostrado la interacción de los AE con los mecanismos multidroga de expulsión activa de diversos antimicrobianos, destacando la inhibición de la bomba efflux por los AE como un posible mecanismo de sinergia (Chovanová et al., 2015). Sin embargo, son pocos los estudios sobre la aparición de resistencia a los AE por mutaciones genéticas (Budzyńska et al., 2013), principal mecanismo de resistencia de las enterobacterias a las fluoroquinolonas y SXT (Mosquito et al., 2011). El último objetivo de esta tesis, fue determinar la posible aparición de cepas de *Salmonella* Typhimurium, mutantes de un solo paso resistentes al AEO (seleccionado en base al potencial microcida demostrado con las cepas ensayadas), y la estimación de la concentración de prevención de mutantes (MPC). Los resultados obtenidos en el test de inducción no mostraron alteraciones en la susceptibilidad de las cepas a este AE, coincidiendo con los hallazgos de Budzyńska et al. (2013) con *Candida* spp. y los AE de clavo y geranio, y con las apreciaciones realizadas por otros autores sobre la dificultad para desarrollar resistencia a los AE como consecuencia de la diversidad de mecanismos de acción que les confiere su compleja composición química (Becerril et al., 2012; Budzyńska et al., 2013; Dantas et al., 2016).

En base a lo anteriormente expuesto, consideramos que los AE probados en esta tesis constituyen una alternativa eficaz, solos o combinados con los antimicrobianos tradicionales, para el control de las infecciones por *Salmonella enterica* y la reducción de las resistencias bacterianas.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES



VII. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio confirman el potencial antimicrobiano de los AE de orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar o común, y demuestran su carácter bactericida con una CMI₉₀ y una CMB₉₀ para las cepas estudiadas de *Salmonella enterica* de 625 µg/mL. La diferencia hallada con los estudios previos constata el valor de estos parámetros como referencia para la determinación de los puntos de corte de susceptibilidad/resistencia, si bien es aconsejable realizar más estudios de distribución de la susceptibilidad a más cepas de campo.
2. Se encontraron diferencias significativas en la susceptibilidad de los serotipos Enteritidis y Typhimurium a los AE de canela y clavo, siendo la actividad de los AE de orégano y tomillo similar para ambos serotipos.
3. La detección de cepas de *S. Typhimurium* con valores de CMI por encima del rango de valores más frecuente para cuatro de los cinco AE probados, sugiere un posible perfil de multirresistencia (MDR) frente a los AE.
4. En base al efecto sinérgico observado entre los aceites de canela, clavo, orégano y tomillo rojo y los antimicrobianos trimetoprim-sulfametoxazol, ceftiofur y enrofloxacin, la combinación AE-AMB podría constituir una medida eficaz de control frente a cepas multirresistentes de *Salmonella enterica*.
5. Las sinergias encontradas se tradujeron en una disminución de la concentración efectiva de ambos productos, destacando especialmente la potenciación observada

entre la enrofloxacin (con una disminuci3n de la CMI de 2 a 0,03125 µg/mL) y la canela (cuya CMI disminuy3 de 1250 y 625 µg/mL a 312,5 y 156,25 µg/mL, respectivamente).

6. Los resultados del test de inducci3n de resistencia al AE de 3r3gano por posibles mutaciones de ‘un solo paso’ demostraron el crecimiento de cepas de *S. Typhimurium* a concentraciones superiores a la CMI, si bien no se confirm3 en ning3n caso una reducci3n de su susceptibilidad, lo que deja abierto este campo a futuros estudios.

7. A excepci3n del AE de 3r3gano, el test de inducci3n con enrofloxacin mostr3 una reducci3n en la susceptibilidad de las cepas salvajes que permiti3 su crecimiento a concentraciones 1x y 2x CMI, determinando una MPC de 4 veces este valor. La ausencia de mutaciones gen3ticas en la regi3n *QRDR* de estas cepas apoyaría la implicaci3n de otros mecanismos de resistencia.

8. Consideramos que los resultados de esta Tesis Doctoral apoyan el potencial de los AE (especialmente de 3r3gano, tomillo y canela) como una alternativa eficaz, solos o en combinaci3n con los AMB tradicionales, para el control de las infecciones por *Salmonella enterica* y como estrategia para disminuir el desarrollo de nuevas resistencias bacterianas. Adem3s, concluimos que es preciso continuar los estudios *in vitro* de distribuci3n de la susceptibilidad, las investigaciones sobre los mecanismos que determinan la sinergia, as3 como su toxicidad *in vivo* y el desarrollo de posibles mecanismos de resistencia.

CAPÍTULO VIII

RESUMEN/SUMMARY



RESUMEN

Los animales de abasto son reservorio de bacterias resistentes para el hombre debido al contacto directo y al consumo de alimentos. La creciente inquietud por la seguridad alimentaria “*desde la granja a la mesa*” ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de los microorganismos implicados en toxiinfecciones alimentarias, cuyo representante principal es *Salmonella* spp.

En el año 2003, la Unión Europea (UE) alertaba del incremento de las resistencias bacterianas, asociado al uso indiscriminado de los antimicrobianos (AMB), como un problema grave de salud pública. Debido al carácter zoonótico de la mayoría de procesos contagiosos que afectan al hombre, los animales constituyen un importante reservorio de bacterias resistentes. Las organizaciones nacionales e internacionales de control y vigilancia de enfermedades han encendido las alarmas debido al alto nivel de resistencia a los antimicrobianos de uso común en humanos y animales por parte de géneros bacterianos como *Salmonella* y *Campylobacter*, así como la gran difusión de cepas multirresistentes por toda la UE.

Desde la prohibición del uso de los antibióticos como promotores del crecimiento animal en enero de 2006, se han incrementado los estudios con nuevas sustancias, como los ácidos orgánicos y los aceites esenciales (AE) extraídos de plantas y especias. La mayoría de estos productos se utilizan en sanidad animal como aditivos alimentarios, y su aprobación como terapéuticos precisa de estudios que demuestren su eficacia como AMB, así como su efecto

sobre la producción animal y su seguridad para la salud humana, animal y medioambiental.

Teniendo en cuenta éstos antecedentes, se consideró pertinente realizar la siguiente Tesis Doctoral buscando determinar el potencial de cinco AE para su uso, solos o en combinación con antimicrobianos, en el control de la infección por *Salmonella* spp. en los animales.

El primer objetivo consistió en valorar la actividad antimicrobiana de los AE de canela, clavo, orégano, tomillo común y tomillo rojo frente a 85 cepas de *Salmonella* spp. pertenecientes a 23 serotipos de importancia en salud pública y aisladas de distintas especies animales. Se desarrolló un ensayo *in vitro* utilizando el método de microdilución en caldo, se valoró la actividad inhibidora (Concentración Mínima Inhibitoria - CMI) y bactericida (Concentración Mínima Bactericida - CMB) de los AE frente a las cepas del estudio, Para determinar el potencial microcida se estimó el índice CMB/ obteniendo los mejores resultados con los AE de orégano, tomillo rojo y tomillo común.CMI, encontrando en todos los casos valores próximos a la unidad. Teniendo en cuenta las diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas a un mismo AE, se calculó la CMI₅₀, CMI₉₀, CMB₅₀ y CMB₉₀; los resultados mostraron el carácter bactericida de los AE probados frente a *S. enterica*. Así mismo, apoyan el potencial antimicrobiano de los AE de orégano, tomillo rojo y tomillo común. La aplicación de estos resultados al trabajo de laboratorio microbiológico de rutina también requeriría la determinación de puntos de corte clínicos de sensibilidad y resistencia, siendo la distribución de la sensibilidad de la población bacteriana un punto de referencia para futuras investigaciones.

El segundo objetivo fue evaluar el efecto *in vitro* de la combinación de los AE de canela, clavo, orégano y tomillo rojo con enrofloxacin (ENR), ceftiofur (CEF) y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), por ser AMB comúnmente usados en la práctica veterinaria, frente a 15 cepas clínicas de *S. enterica* resistentes a múltiples fármacos (Multiple Drug Resistance, MDR) de origen animal. El efecto combinado entre los AE y los AMB se evaluó siguiendo el método de *Checkerboard*. Los resultados fueron interpretados por el cálculo de la Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF) y sus respectivos índices (CIFI). En términos generales, se observó una significativa susceptibilidad de las quince cepas frente a los cuatro AE probados. Los resultados obtenidos mostraron efecto sinérgico entre los AE y los AMB ensayados, destacando el porcentaje superior de sinergias totales del SXT con los cuatro AE ($CIFI \geq 0,5$ en el 60% de los ensayos) y siendo la combinación más efectiva la de ENR y el AE de canela. Así mismo, la CMI del AE de canela se redujo de 1250 a 312,5 $\mu\text{g/mL}$ y la CMI de la ENR de 2 a 0,031 $\mu\text{g/mL}$. De esta manera, los resultados de este ensayo muestran que los AE de canela, clavo, orégano y tomillo rojo son eficaces para mejorar la sensibilidad de las cepas MDR de origen animal clínico de *S. enterica* a SXT, CEF y ENR.

Como tercer y último objetivo de la presente tesis doctoral se ha buscado determinar la posible aparición de subpoblaciones de cepas de *Salmonella* spp. mutantes de un solo paso resistentes al AE de orégano, estimando la Concentración de Prevención de Mutantes (MPC). Para lograr el objetivo planteado y como control de calidad de los ensayos realizados, se efectuaron los siguientes estudios previos: primero inducir la aparición de cepas mutantes con sensibilidad reducida a la ENR obtenidas a partir de 3 cepas clínicas de *S.*

S. Typhimurium de origen porcino; seguidamente, establecer MPC y caracterizar molecularmente la región determinante de resistencia a las quinolonas (*QRDR*). Una vez cumplidos estos objetivos se desarrolló el mismo ensayo para inducir la aparición de cepas mutantes resistentes y estimar la MPC utilizando el AE de orégano. Adicionalmente, el estudio se amplió investigando la posibilidad de prevenir el crecimiento selectivo de las cepas resistentes a ENR mediante el uso de los AE de canela, orégano, tomillo común y tomillo rojo. Para determinar las CMI de la ENR y el AE de orégano se emplearon los métodos de microdilución en caldo y la dilución en agar. Para establecer la MPC se utilizó un inóculo bacteriano $\geq 10^9$ UFC/mL cultivado en concentraciones de 1x a 64x veces la CMI para ENR y de 1x a 16x veces la CMI para el AE de orégano, y para examinar la base molecular de resistencia a ENR mutaciones puntuales de los genes diana *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* de la región *QRDR*.

Las tres cepas de *S. Typhimurium* empleadas en este estudio mostraron para la ENR una MPC de 4 veces la CMI (MPC=0,25 µg/mL). En todos los casos se obtuvieron cepas con susceptibilidad reducida a la ENR (MPC/CMI=4), aunque ninguna de ellas alcanzó el punto de resistencia. La caracterización de la región *QRDR* de las cepas originales y de las cepas obtenidas en la inducción mostró en todos los casos el tipo salvaje (*wt*), sin que se manifestaran mutaciones genéticas.

Con respecto a los resultados del mismo ensayo utilizando el AE de orégano, a diferencia de los resultados obtenidos con la ENR, la MPC de este AE fue para las 3 cepas ensayadas de 1 vez la CMI (MPC = 625 µg/mL), sin presentarse crecimiento en placas sub-MPC (2x a 64x veces la CMI).

Los AE de canela, orégano, tomillo común y tomillo rojo mostraron una fuerte actividad antimicrobiana frente a cepas de *S. Typhimurium* con susceptibilidad reducida a la ENR (CMI 312,5 - 625 µg/mL) obtenidas a partir de las cepas originales.

En base a los hallazgos encontrados en la presente investigación, es pertinente indicar que los AE de canela, clavo, orégano, tomillo común y tomillo rojo podrían ser potencialmente activos, solos o en combinación con otros antimicrobianos, para el control de las infecciones producidas por *Salmonella* spp.

SUMMARY

Farmed animals are reservoirs of resistant bacteria for humans, who could be infected by means of direct contact and food consumption. The increasing interest in food safety "*from farm to table*" has led to the search for new alternatives for the control of microorganisms involved in food poisoning, which main representative is *Salmonella* spp.

In 2003, the European Union (EU) warned of the increase in bacterial resistance associated with the indiscriminate use of antimicrobials (AMB) as a serious public health problem. Due to the zoonotic nature of the most of contagious processes affecting humans, animals constitute an important reservoir of resistant bacteria. National and international disease control and monitoring organizations have triggered alarms because of the high level of resistance of bacteria, such as *Salmonella* and *Campylobacter*, against AMB commonly used in humans and animals, as well as the widespread multi-resistant strains throughout the EU.

Since the ban on the use of antibiotics as promoters of animal growth in January 2006, studies have been increased with new substances, such as organic acids and essential oils (EOs) extracted from plants and spices. Most of these products are used in animal health as food additives, and their approval as therapeutic requires studies demonstrating their effectiveness as AMB, as well as their effect on animal production and their safety for human, animal and environmental health.

Taking into account these antecedents, it was considered appropriate to carry out the following Doctoral Thesis in order to determine the potential of five

EOs in the control of *Salmonella* spp. infections in animals, either used alone or in combination with antimicrobials.

The first objective was to evaluate the antimicrobial activity of the EOs of cinnamon, clove, oregano, common thyme and red thyme against of 85 strains of *Salmonella* spp. belonging to 23 serotypes of importance in public health and isolated from different animal species. An *in vitro* assay was developed using the broth microdilution method. The inhibitory activity (Minimal Inhibitory Concentration - MIC) and bactericidal activity (Minimal Bactericidal Concentration - MBC) of the EOs against the strains under study were evaluated, obtaining the best results with the EO of oregano, red thyme and common thyme. To determine the microcide potential, the MBC/MIC index was estimated, finding in all cases values close to unit. Taking into account the significant differences in the sensitivity of the strains to the same EO, the MIC₅₀, MIC₉₀, MBC₅₀ and MBC₉₀ were calculated. The results showed not only the bactericidal character of the EOs tested against *S. enterica*, but also the antimicrobial potential of EOs of oregano, common thyme and red thyme. The application of these results to routine microbiological laboratory work would also require the determination of clinical cut-off points of sensitivity and resistance, being the distribution of the sensitivity of the bacterial population a point of reference for future investigations.

The second objective was to evaluate the *in vitro* effect of the combination of EOs of cinnamon, clove, oregano and red thyme with enrofloxacin (ENR), ceftiofur (CEF) and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT); AMB commonly used in practice veterinary. Their activity were tested against 15 clinical strains of *S. enterica* multidrug resistant (MDR) of animal origin. The combined effect between EO and AMB was evaluated using the *Checkerboard* method. The results

were interpreted by the calculation of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) and their respective indices (FICI). In general terms, a significant susceptibility of the 15 strains was observed in comparison to the four EOs tested. The results obtained showed a synergistic effect between the EOs and the AMB tested, highlighting the high percentage of total synergies of the SXT with the four EOs (FICI ≥ 0.5 in 60% of the trials) and the effective combination of ENR and cinnamon EO. Likewise, the MIC of the cinnamon EO was reduced from 1250 to 312.5 $\mu\text{g/mL}$ and the MIC of the ENR from 2 to 0.031 $\mu\text{g/mL}$. Thus, the results of this trial show that the EOs of cinnamon, clove, oregano and red thyme are effective to improve the sensitivity of the clinical animal origin MDR strains of *S. enterica* to SXT, CEF and ENR.

As a third and final objective of this Doctoral Thesis it has been attempted to determine the possible occurrence of subpopulations of strains of *Salmonella* spp. single-pass mutants resistant to oregano EO, estimating the Mutant Prevention Concentration (MPC). To achieve the stated objective and as quality control of the tests carried out, the following previous studies were carried out: firstly, inducing the appearance of mutant strains with reduced sensitivity to ENR from 3 clinical strains of *S. Typhimurium* of porcine origin; and then, establishing MPC and molecularly characterizing the determinant region of quinolone resistance (*QRDR*). Once these objectives were achieved, the same assay was developed to induce the emergence of resistant mutant strains and to estimate MPC using oregano EO. Additionally, the study was expanded investigating the possibility of preventing the selective growth of ENR resistant strains by the use of EOs of cinnamon, oregano, common thyme and red thyme. The broth microdilution and agar dilution methods were used to determine the MIC of ENR

and EO of oregano. To establish MPC, a bacterial inoculum $\geq 10^9$ CFU / mL was used, cultured in concentrations from 1x to 64x times the MIC for ENR and from 1x to 16x times the MIC for oregano EO. To examine the molecular basis of resistance to ENR, a PCR was carried out in order to detect point mutations of the target genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* of the *QRDR* region.

The three strains of *S. Typhimurium* used in this study showed a MPC of 4 times the MIC (MPC = 0.25 $\mu\text{g/mL}$) for ENR. In all cases, strains with reduced susceptibility to ENR (MPC/MIC = 4) were obtained, although none of them reached the point of resistance. The characterization of the *QRDR* region of the original strains and the strains obtained in the induction showed in all cases the wild type (*wt*), without any genetic mutations.

With respect to the results obtained for oregano EO, which differ with the ones obtained for ENR, the MPC of this EO was once the MIC (MPC = 625 $\mu\text{g/mL}$) for the 3 tested strains, without growth in sub-MPC plaques (2x to 64x times the MIC). The EOs of cinnamon, oregano, common thyme and red thyme showed strong antimicrobial activity against the strains of *S. Typhimurium* with reduced susceptibility to ENR (MIC 312.5 - 625 $\mu\text{g/mL}$) obtained from the original ones.

Basing on the findings obtained in the present investigation, EOs of cinnamon, clove, oregano, common thyme and red thyme may be potentially active, either used alone or in combination with other antimicrobials, for the control of infections caused by *Salmonella* spp.

CAPÍTULO IX
DIVULGACIÓN Y
APORTACIONES CIENTÍFICAS




IX. DIVULGACIÓN Y APORTACIONES

Aportaciones a Congresos Internacionales:


- ✓ International Symposium of *Salmonella* and Salmonellosis i3S 2016. Del 6 al 8 de junio de 2016 en Saint-Malo (Francia). Presentación de comunicación escrita en la modalidad de póster, titulado: ***In vitro* assay to assess the antimicrobial activity of essential oils against clinical strains of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis.**

- ✓ IV International Conference on Antimicrobial Research ICAR 2016. Del 29 de junio al 01 de julio de 2016 en Torremolinos (España). Presentación de comunicación escrita en la modalidad de póster, titulado: ***In vitro* effect of the combination of enrofloxacin with essential oils against *Salmonella* Typhimurium.**



- ✓ 12TH International Conference SAFEPOK 2017. Del 21 al 24 de agosto de 2017 en Foz Do Iguaçu (Brasil). Presentación de comunicación escrita en la modalidad de póster, titulado: Presentación de comunicación escrita en la modalidad de póster, titulado: **Induction of resistant mutants of *Salmonella* Typhimurium under enrofloxacin and natural alternatives for control in pigs.**




International Symposium
Salmonella and
Salmonellosis
Saint-Malo France
6 - 7 - 8 June 2016





International Symposium
Salmonella and
Salmonellosis
Saint-Malo France
6 - 7 - 8 June 2016

IN VITRO ASSAY TO ASSESS THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST CLINICAL STRAINS OF *Salmonella* Typhimurium AND *S. Enteritidis*



Ana L. SOLARTE, Rafael J. ASTORGA, Fabiana C. AGUIAR, Belén BARRERO, Ángela GALÁN, Alfonso MALDONADO, Belén HUERTA
Animal Health Department, Veterinary Faculty, University of Córdoba, Spain
International Excellence Agrifood Campus, CeIA3, 14071 Córdoba, Spain

I. INTRODUCTION & OBJECTIVE

Food-borne infections caused by *Salmonella* genus are one of the main Public Health problems. In order to control these zoonotic agents, a specific Regulation (2160/2003) was published by the European Union in 2003 where multidrug-resistant bacterial strains associated with animal species was highlighted generally associated with inappropriate use or overuse of antimicrobials in veterinary medicine. The increasing concern about food safety "from farm to table" has led to the European Commission in 2006 to ban the use of antibiotics as animal growth promoters, starting research of new antimicrobials as organic acids, essential oils and plants and spices extracts.

For this purpose, an *in vitro* assay to assess the antimicrobial activity of five essential oils against clinical strains of *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis have been developed, for further study *in vivo* in livestock.

II. MATERIAL & METHODS

Five essential oils (cinnamon, cloves, oregano, common and red thyme) of natural origin were tested, with a purity of 100% (Aromium®, Spain), and compared with 37 strains (25 *S. Typhimurium* and 12 *S. Enteritidis*) isolated from clinical cases and different animal species (equine, porcine, quail, canary, chicken, rodent, primate, goat, rabbit and snake).

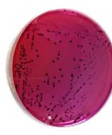


For quality control the reference strain of '*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 14028' and a reference drug as 'Enrofloxacin' were included.

Assays were performed in triplicate by means the broth microdilution test for each oil and strain (CLSI, 2009), including positive and negative controls quality. From the results obtained the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC), microcidal power (MBC/MIC ratio), MIC₅₀₋₉₀ and MBC₅₀₋₉₀ were determined.

III. RESULTS

MIC and MBC: essential oils with higher activity against both serotypes were oregano, red and common thyme, MICs values between 472.9-604.2 µg/ml from *S. Typhimurium* and 312.5-625 µg/ml from *S. Enteritidis*. Bacterial kill was achieved at concentrations of 581.2-937.5 µg/ml and 312.5-677.1 µg/ml, respectively, which determined a microcidal power for three oils very close to 1 (strong bactericidal character).

MIC₅₀₋₉₀ and MBC₅₀₋₉₀: essential oils of oregano and red thyme ability to inhibit and kill 90% of the *Salmonella* strains tested at a concentration of 625 µg/ml, value slightly higher than the toxicity threshold described by some authors (500 µg/ml). However, oregano destroyed 81% of the strains at a concentration of 312.5 µg/ml.

IV. CONCLUSIONS

According to the results obtained we believe that essential oil of oregano could be a good alternative for the control of infections by *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, although it should *in vivo* testing to assess its efficacy and safety in animals for slaughter.

<i>S. Typhimurium</i>			<i>S. Enteritidis</i>	
Essential oil	Mean±SD	Mode	Mean±SD	Mode
Oregano	472.9 ± 507.6	312.5	312.5 ± 0.00	312.5
Red thyme	514.6 ± 604.1	312.5	625 ± 0.00	625
Common thyme	604.2 ± 945.2	312.5	625 ± 0.00	625
Cloves	958.3 ± 269	1041.7	1250 ± 0.00	1250
Cinnamon	1216.7 ± 369.2	1250	546.9 ± 141.3	625

Table 1. Results of MIC (µg/ml) of selected essential oils against strains of *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis*.

<i>S. Typhimurium</i>			<i>S. Enteritidis</i>	
Essential oil	Mean±SD	Mode	Mean±SD	Mode
Oregano	581.2 ± 800.4	312.5	312.5 ± 0.00	312.5
Red thyme	677.1 ± 1014.8	312.5	625 ± 0.00	625
Common thyme	937.5 ± 1923.3	312.5	677.1 ± 180.4	625
Cloves	1133.3 ± 485.2	1041.7	1250 ± 0.00	1250
Cinnamon	1491.7 ± 996.7	1250	625 ± 0.00	625

Table 2. Results of MBC (µg/ml) of selected essential oils against strains of *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis*.

Contact and references: z32sopoa@uco.es



IV International Conference on Antimicrobial Research

29 June - 1 July 2016 Torremolinos - Malaga, Spain

IN VITRO EFFECT OF THE COMBINATION OF ENROFLOXACIN WITH ESSENTIAL OILS AGAINST *Salmonella* Typhimurium

A. L. Solarte, F. C. De Aguiar, R. J. Astorga, A. Maldonado, B. Barrero, F. Jurado and M. B. Huerta
Animal Health Department, Faculty of Veterinary Medicine. Córdoba, Spain.
Agrifood Campus of International Excellence ceiA3. University of Córdoba





INTRODUCTION

Traditionally, the control of infectious diseases in humans and animals has been based on the use of antibiotics, especially broad-spectrum fluoroquinolone. However, in recent decades, international organizations have warned of increased bacterial resistance, resulting in treatment failure. Investigations with essential oils (EOs) cinnamon, clove, oregano and thyme show that have a remarkable antimicrobial activity against *Salmonella*, although in the case of oregano and thyme cytotoxic effect can occur at concentrations <500 µg/ml [1].



The aim of our study was to evaluate the *in vitro* effect of the combination of enrofloxacin and EOs of cinnamon, cloves, oregano, red thyme and common thyme against two strains of *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028, sensitive to enrofloxacin, and a strain avian field, resistant to this antibiotic).

MATERIALS AND METHODS

Using the checkerboard technique of double serial dilutions of essential oil and antibiotic clashed, starting at a dilution two or three times higher than the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of each product individually. Based on the results the index of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) is determined, considering a value < 0.5 (synergism), FIC = 0.5-1 (partial synergism), FIC = 1-4 (indifference) and FIC > 4 (antagonism) [2].



RESULTS

The best results were obtained with the combination of EO of cinnamon and enrofloxacin against the resistant strain (FIC 0.53, partial synergism), observed a marked reduction from individual MIC (cinnamon 1250 µg/ml and enrofloxacin 2 µg/ml to 0.0625 µg/ml). For reference strain (sensitive to enrofloxacin), while the MIC of the antibiotic was reduced from 0.125 µg/ml to 0.0039 µg/ml, the MIC cinnamon remained at 625 µg/ml (FIC 1.03, indifference). The latter result was also observed with enrofloxacin and clove. Finally, note that none of the combinations turned out to be antagonistic.




CONCLUSIONS

Based on these results, we conclude that the joint use of cinnamon and enrofloxacin might be a good option for controlling infection caused by *S. Typhimurium*, mainly fluoroquinolones-resistant strains. Although it is necessary to continue the study with more field strains and perform tests *in vivo* safety and toxicity in an animal model.

REFERENCES

[1] Dusan F., Marian S., Katarina D., & Dobroslava B. (2006). Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro*; 20: 1435-1445

[2] Hongbin S., Jinqiang H., Zhichang L., & Zhen-ling Z. (2008). Antibacterial Effect of Oregano Essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 53: 190-194



INDUCTION OF RESISTANT MUTANTS OF *Salmonella* Typhimurium UNDER ENROFLOXACIN AND NATURAL ALTERNATIVES FOR CONTROL IN PIGS

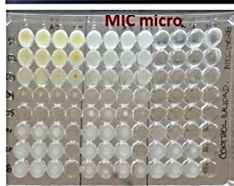
Ana Lucía Solarte^a, Rafael Jesús Astorga^a, Fabiana De Aguiar^a, Alfonso Maldonado^a, Ángela Galán-Relaño^a and Belén Huerta^a
^aAnimal Health Department, University of Córdoba, Campus of Rabanales, 14071, Córdoba, Spain ¹International Excellence Agrifood Campus, CeIA3¹.

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Fluoroquinolones are commonly used in the control of *Salmonella* infections in veterinary practice and human medicine. The increase in bacterial resistance to these antimicrobials in recent years has been associated with the selective growth of single-step mutant strains resistant to the frequent dose in use, based on the minimum inhibitory concentration (MIC). The objective of this study was to induce the emergence of single-step mutants of enrofloxacin (ENR) resistant *S. Typhimurium* strains and to test the antimicrobial activity of essential oils (EOs).

MATERIAL AND METHODS

Two clinical strains susceptible to ENR of *S. Typhimurium*, isolated from clinical cases of pigs, and the reference strain ATCC 14028 were subjected to study, an inoculum $\geq 10^{10}$ CFU/mL was obtained. This inoculum was cultured for 5 days on Müller Hinton agar plates supplemented with ENR (1x to 64x fold MIC) to identify the mutant strains and to determine the concentration of mutant prevention (MPC). The original strains and a selection of the strains obtained after induction were put together with the EOs of cinnamon, oregano, red thyme and vulgar thyme, by means of microdilution technique and studied by polymerase chain reaction (PCR). They were also subjected to sequencing with the aim of detecting mutations in the genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* (resistance determining region to quinolones, QRDR).

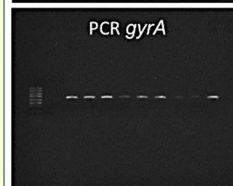


RESULTS

In all assays, strains with reduced susceptibility to enrofloxacin (MPC/MIC = 4) were obtained, although none of them reached the point of resistance.

Characterization of QRDR region of the original strains and the strains obtained in the induction showed the wild type (wt) of the genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*. However, none of them presented genetic mutations.

The EOs of cinnamon, oregano, red thyme and common thyme demonstrated a strong antimicrobial activity against *S. Typhimurium* strains with reduced susceptibility to enrofloxacin (MIC 312.5 - 625 µg/mL).



CONCLUSIONS

- ✓ The reduction observed in the susceptibility to ENR of the tested strains, without isolated mutations in the target genes of the QRDR region, supports the importance of other mechanisms described for the development of quinolone resistance (alterations in external membrane and the active efflux pump).
- ✓ The selective growth of strains with reduced susceptibility to concentrations of ENR higher than MIC, highlights the importance of MPC in the determination of dosage regimens.
- ✓ The results of this research show that EOs of cinnamon, oregano, common thyme and red thyme are able to control the growth of strains with reduced susceptibility to ENR arising by exposure to sub-MPC doses. These EOs and/or their combination with ENR would prevent the selective growth of resistant bacterial subpopulation and, in consequence, therapeutic failure.

Referencias : sa2hulob@uco.es

Aportaciones a Congresos Nacionales:

- ✓ XX Simposio de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio AVEDILA. Del 5 al 6 de noviembre de 2015 en Gijón (España). Presentación de comunicación escrita póster, titulado: **Aplicación de aceites esenciales para el control de *Salmonella* Typhimurium aislada de casos clínicos en diferentes especies animales.**

- ✓ V Congreso Científico de Investigadores en formación de la Universidad de Córdoba– Creando Redes. Del 30 de noviembre al 1 de diciembre de 2016 en Córdoba (España). Presentación de comunicación escrita-póster, titulado: **Efecto *in vitro* de la combinación de enrofloxacin con aceites esenciales frente a *Salmonella* Typhimurium.**

XX

SIMPOSIO ANUAL
AVEDILA



5 - 6 NOVIEMBRE, 2015
Gijón, Asturias

APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE *Salmonella* Typhimurium AISLADA DE CASOS CLÍNICOS EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES



A. Solarte, F. Aguiar, R. J. Astorga, A. Galán-Relaño, A. Maldonado, B. Huerta.

Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba
Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, CeIA3.

Los animales de abasto constituyen el principal reservorio de bacterias resistentes para el hombre a través del contacto directo y el consumo de alimentos. La creciente inquietud por la seguridad alimentaria “desde la granja a la mesa” ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de los microorganismos implicados en toxi-infecciones alimentarias, como salmonela.

Hemos desarrollado un ensayo *in vitro* para valorar la actividad antimicrobiana de 10 aceites esenciales frente a 23 cepas de *S. Typhimurium*, aisladas de casos clínicos en distintas especies animales.

Realizamos un estudio inicial de cribado, mediante el Test de difusión por discos (Fig.1) frente a diez de las cepas, donde se determinó la ausencia de actividad del aceite de naranja y a su vez se seleccionaron los aceites de tomillo rojo, orégano, tomillo vulgar, clavo y canela para su estudio cuantitativo (diámetro halo de inhibición 15,07-20,87mm) (Tabla 1).

Figura 1

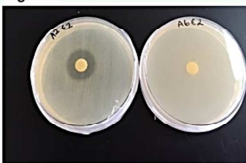
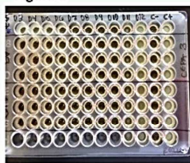


Figura 2



Posteriormente, mediante Microdilución en caldo (Fig.2) se valoró la actividad inhibidora (CMI) y bactericida (CMB) frente a las 23 cepas del estudio, obteniendo los mejores resultados con el orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar (CMIs 0,05-0,125% y CMBs 0,06-0,15%) (Tabla 1).

Para determinar la potencia microcida (Tabla 2) se estimó el índice CMB/CMI, encontrando en todos los casos valores próximos a la unidad, lo que demuestra la capacidad de estos aceites para inhibir y destruir la bacteria con una misma concentración.

Tabla 1

Aceite Esencial	Método de Difusión por disco	Método de Microdilución	
	Ø (mm) ± SD	CMI% ± SD	CMB % ± SD
Naranja	6 ± 0,00	-	-
Ajo	8 ± 0,64	-	-
Romero	8,93 ± 0,69	-	-
Estragón	8,97 ± 0,49	-	-
Menta	9,27 ± 0,91	-	-
Canela	15,07 ± 0,58	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,10
Clavo	15,43 ± 0,73	0,09 ± 0,03	0,11 ± 0,05
Orégano	20,60 ± 1,97	0,05 ± 0,05	0,06 ± 0,08
Tomillo vulgar	19,50 ± 1,40	0,06 ± 0,10	0,10 ± 0,20
Tomillo rojo	20,87 ± 1,63	0,05 ± 0,06	0,07 ± 0,11

Tabla 2

Potencia Microcida (Índice CMB/CMI)

	Orégano	Tomillo rojo	Tomillo vulgar	Clavo	Canela
CMB/CMI	1,22 ± 0,58	1,22 ± 0,67	1,38 ± 0,61	1,26 ± 0,66	1,22 ± 0,56

Destacamos la capacidad del aceite esencial de orégano para inhibir y destruir el 50% y el 90% de las cepas estudiadas a una concentración del 0,03% y 0,06% respectivamente, con un índice igual a la unidad (CMB₅₀/CMI₅₀ y CMB₉₀/CMI₉₀ =1). En base a ello, consideramos que este aceite podría ser una buena alternativa para el control de las infecciones por *S. Typhimurium*.

Referencias : sa2hulob@uco.es



EFFECTO *IN VITRO* DE LA COMBINACIÓN DE ENROFLOXACINA CON ACEITES ESENCIALES FRENTE A *Salmonella* Typhimurium

Solarte A. L., Tarradas C., Huerta B.

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Medicina Veterinaria. Córdoba, España.
Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3. Universidad de Córdoba



INTRODUCCIÓN

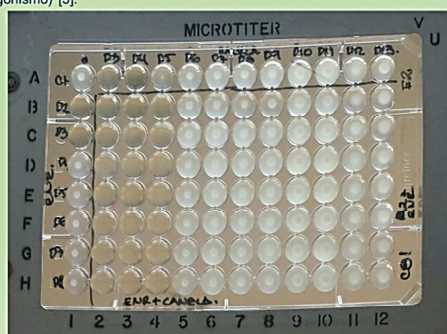
Tradicionalmente, el control de la Salmonelosis en humanos y animales se ha basado en el uso de antibióticos, especialmente fluoroquinolonas de amplio espectro. Sin embargo, en las últimas décadas, las organizaciones internacionales han advertido sobre el aumento de la resistencia bacteriana, que tiene como consecuencia el fracaso de los tratamientos [1]. Las investigaciones *in vitro* han demostrado el gran potencial antimicrobiano de los aceites esenciales (AEs.) que a penas generan resistencias, si bien presentan un efecto citotóxico dosis-dependiente [2]. Por ello, se están desarrollando estudios sobre posibles sinergias entre los aceites esenciales y diversos antimicrobianos, a fin de reducir las resistencias bacterianas y evitar los efectos adversos [3].



El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el efecto *in vitro* de la combinación de enrofloxacin y los AEs de canela, clavo, orégano, tomillo rojo y tomillo común frente a *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028 sensible a la enrofloxacin) y una cepa clínica aviar referencia: 81-510/04 resistente a este antibiótico.

METODOLOGÍA

Mediante la técnica de microdilución en damero (checkerboard) [4] se mezclaron volúmenes iguales en los pocillos de ensayo siguiendo este esquema: en el eje X se colocaron concentraciones crecientes del aceite y en el eje Y, concentraciones crecientes de la enrofloxacin, de tal forma que el inóculo final de ensayo fue de 5×10^5 ufc/ml y los productos quedaron diluidos a la mitad de su concentración inicial. Con base en los resultados se determinó el índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada (FIC), considerando un valor <0.5 (sinergismo), $FIC = 0.5-1$ (sinergismo parcial), $FIC = 1-4$ (indiferencia) y $FIC > 4$ (antagonismo) [5].



Contacto: z32sopoa@uco.es

RESULTADOS

Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación del aceite esencial de canela y la enrofloxacin. En el caso de la cepa Ref. 81-510/04, se observó un sinergismo parcial (FIC 0.53) y una notable reducción de la concentración inhibitoria de ambos productos respecto a sus CMI individuales (canela de 1250 µg/ml a 625 µg/ml y enrofloxacin de 2 µg/ml a 0.0625 µg/ml). Para la cepa de referencia (sensible a la enrofloxacin) la combinación resultó indiferente, si bien se produjo una reducción en la CMI del antibiótico de 0.125 µg/ml a 0.0039 µg/ml (Tabla 1). Por otro lado, observamos que la combinación de los aceites esenciales de tomillo vulgar y rojo con la enrofloxacin no sólo resultó indiferente, sino que se detectó un aumento en la CMI de estos aceites muy por encima del umbral de toxicidad. Por último, resaltar que ninguna de las combinaciones resultó antagonista.

Producto	CMI µg/ml		CMI µg/ml		CIFI		Efecto	
	ATCC	Ref.	ATCC	Ref.	ATCC	Ref.	ATCC	Ref.
Canela	14028	81-510/04	14028	81-510/04	14028	81-510/04	14028	81-510/04
ENR	625	1250	625	625	1.03	0.53	Indiferente	Sinergismo Parcial
Clavo	1250	1250	1250	1250	1.03	1.25	Indiferente	Indiferente
ENR	0.125	2	0.0039	0.5	2.03	1.5	Indiferente	Indiferente
Orégano	625	625	1250	312.5	2.03	2	Indiferente	Indiferente
ENR	0.125	2	0.0039	2	2.03	2	Indiferente	Indiferente
T. vulgar	625	625	1250	625	2.03	2	Indiferente	Indiferente
ENR	0.125	2	0.0039	2	2.03	2	Indiferente	Indiferente
T. rojo	625	625	1250	625	2.03	2	Indiferente	Indiferente
ENR	0.125	2	0.0039	2	2.03	2	Indiferente	Indiferente

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CIFI: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada. AE: Aceite Esencial. ENR: Enrofloxacin

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo suponen una primera aproximación al estudio del efecto sinérgico entre los aceites esenciales y la enrofloxacin para el control de las infecciones por *S. Typhimurium*, principalmente resistentes a fluoroquinolonas, si bien, es preciso continuar el estudio con más cepas clínicas y realizar ensayos *in vivo* de seguridad y toxicidad en un modelo animal.

REFERENCIAS

- [1] European Food Safety Authority-EFSA & European Centre for Disease Prevention and Control-ECDC. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal, 2015, p. 4036.
- [2] F. Dušan, S. Marián, D. Katarina, & B. Dobroslava. Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. Toxicol In Vitro, 2006, p. 1435-1445.
- [3] P. Yap, B. Yip, H. Ping, & S. Lim. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. The Open Microbiology Journal, 2014, p. 6.
- [4] S. Hongbin, H. Jinqiang, L. Zhichang & Z. Zhen-ling. Antibacterial Effect of Oregano Essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2008, p. 190-194.
- [5] Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnouda, S. K., Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016, p. 71-79.

Aportaciones relacionadas con la formación investigadora, participación en co-autoría:

Congresos Internacionales:

- ✓ IV International Conference on Antimicrobial Research ICAR. Del 29 de junio al 01 de julio de 2016 en Torremolinos (España). Presentación de comunicación escrita – póster, titulado: **Antimicrobial activity of five essential oils against *Streptococcus suis*.**

- ✓ 9TH European Symposium of Porcine Health Management ESPHM. Del 3 al 5 de mayo de 2017 en Praga (República Checa). Presentación de comunicación escrita – póster, titulado: **Microbiological study of totally condemned pigs with disseminated tuberculosis-like lesions.**

- ✓ 9TH European Symposium of Porcine Health Management ESPHM. Del 3 al 5 de mayo de 2017 en Praga (República Checa). Presentación de comunicación escrita – póster, titulado: **Distribution of sensitivity of *Streptococcus suis* strains against various essential oils.**

- ✓ 12TH International Conference SAFEPORK 2017. Del 21 al 24 de agosto de 2017 en Foz Do Iguaçu (Brasil). Presentación de comunicación escrita en la modalidad de póster, titulado: Presentación de comunicación escrita – póster, titulado: **Antimicrobial resistance profile of *Trueperella pyogenes* associated with slaughterhouse condemnations in Spain.**

- ✓ 12TH International Conference SAFEPOK 2017. Del 21 al 24 de agosto de 2017 en Foz Do Iguaçu (Brasil). Presentación de comunicación escrita en la modalidad de póster, titulado: Presentación de comunicación escrita – póster, titulado: **Combination of essential oils and antibiotics against *Streptococcus suis*: a preliminary study.**

Congresos Nacionales:

- ✓ XX Simposio de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio AVEDILA. Del 5 al 6 de noviembre de 2015 en Gijón (España). Presentación de comunicación escrita-póster, titulado: **Estudio de la actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales frente a *Streptococcus suis*.**
- ✓ XXI Simposio de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio (AVEDILA) del 17 al 18 de noviembre de 2016 en Murcia (España). Presentación de comunicación escrita-poster, titulado: **Estudio de la resistencia antimicrobiana de cepas de *Streptococcus suis* aisladas de ganado porcino en España.**
- ✓ V Congreso Científico de Investigadores en formación de la Universidad de Córdoba. Creando Redes. Del 30 de noviembre al 1 de diciembre de 2016 en Córdoba (España). Presentación de comunicación escrita-póster, titulado: **Uso de aceites esenciales para el control de la infección por *Streptococcus suis* en el cerdo.**

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS QUE APORTA LA TESIS DOCTORAL

Artículo científico original:

Derivado del objetivo 2 de la presente tesis doctoral, se publicó el artículo original en la revista ***Foodborne Pathogens and Disease***, indexada en el Journal Citation Reports (JCR), Categoría: Food Science and Technology, Cuartil: Q2, Rango: 38/129, Factor de impacto: 2,120.

Citación:

Solarte, A. L., Astorga, R. J., Aguiar, F., Galán-Relaño, Á., Maldonado, A., & Huerta, B. (2017). Combination of antimicrobials and essential oils as an alternative for the control of *Salmonella enterica* multiresistant strains related to foodborne disease. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(10), 558-563. DOI: 10.1089/fpd.2017.2295.

Combination of Antimicrobials and Essential Oils as an Alternative for the Control of *Salmonella enterica* Multiresistant Strains Related to Foodborne Disease

Ana Lucía Solarte, Rafael Jesús Astorga, Fabiana Aguiar, Ángela Galán-Relaño, Alfonso Maldonado, and Belén Huerta

Abstract

Due to the increase in bacterial resistance to antimicrobials (AMBs) commonly used in veterinary and human medicine, the new strategies for controlling zoonoses focus on the study of natural products with demonstrated AMB activity, such as essential oils (EOs). The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of the combination of enrofloxacin (ENR), ceftiofur (CEF), and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) with cinnamon, clove, oregano, and red thyme EOs against multiple drug-resistant strains of *Salmonella enterica*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each product was determined by microdilution and “Checkerboard” methods and their combined effect was evaluated against 15 strains of *S. enterica*. The results were interpreted by the calculation of fractional inhibitory concentration (FIC) and their respective indexes (FICI). Significant susceptibility of all strains to the four EOs was observed. The results showed a synergistic effect between EOs and AMBs tested, highlighting the upper percentage of total synergies of the SXT with the four EOs (FICI ≤ 0.5 in 60% of assays), and the most effective combination being the one of ENR and cinnamon. The MIC of cinnamon was reduced from 1250 to 312.5 µg/mL and the MIC of ENR from 2 to 0.031 µg/mL. There was no antagonism in the tested combinations (AMBs-EOs). Our results support the combined use of EOs and AMBs for the control of multiresistant strains of *S. enterica* with a reduction of the minimum effective dose of AMBs and their adverse effects.

Keywords: essential oils, antimicrobials, multiresistance, synergism, *S. enterica*

Highlights

- Antimicrobial (AMB)-essential oil (EO) combination on multiresistant *Salmonella* was studied.
- AMBs assayed: enrofloxacin (ENR), ceftiofur (CEF) and sulfamethoxazole-trimethoprim.
- EOs tested: cinnamon, clove, oregano, and red thyme.
- Synergism was observed in all AMB-EO combinations. The highest minimum inhibitory concentration reduction was observed for ENR-cinnamon combination.

Introduction

USUALLY, THE CONTROL of *Salmonella* spp. in humans and animals has been based on the use of antimicrobials (AMBs), especially on broad-spectrum drugs. International health organizations highlight the inappropriate use of these drugs in farmed animals as an important factor to the emergence and spread of resistant bacteria with serious conse-

quences for public health and food industry (Food and Drug Administration-FDA, 2013; Office International des Epizooties-OIE, 2016). The last report of European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) on AMB resistance in zoonotic bacteria emphasizes the wide spread of multiple drug-resistant (MDR) strains of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp., and the high levels of resistance to enrofloxacin (ENR), ceftiofur (CEF), and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) (EFSA, 2015; ECDC, 2016).

Moreover, international committees of experts have indicated the need to search new alternatives for the treatment of infectious diseases (Randall *et al.*, 2016). Among the substances studied with the highest potential are essential oils (EOs), extracted from plants and spices, authorized as animal food supplements, for which bactericidal, anti-inflammatory, immunostimulating, and anticancer properties have been previously described (Becerril *et al.*, 2012; Yap *et al.*, 2014).

Department of Animal Health, Veterinary Faculty, University of Cordoba, Cordoba, Spain.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177-183.
- Abraham, S., Jordan, D., Wong, H. S., Johnson, J. R., Toleman, M. A., Wakeham, D. L., ... & Trott, D. J. (2015). First detection of extended-spectrum cephalosporin-and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 3(4), 273-277.
- Acosta, O., Castro, A., Roque, M., & Felix, L. (2000). Determinación de la composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. Tomillo, determinada por cromatografía de fase gaseosa, espectrometría de masa GCIMS y análisis de su actividad antimicrobiana. *Ciencia e Investigación*, 3(2), 69-78.
- Adley, C. C., & Ryan, M. P. (2016). The nature and extent of food borne disease. In *Antimicrobial Food Packaging, First Edition* (pp. 1–10). Academic Press, San Diego, California, USA.
- Adzitey, F., Huda, N., & Rahmat Ali, G. R. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *L. monocytogenes* in ducks: a review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(6), 498-505.

- Ahmad, A., van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2014). Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules*, 19(3), 2896-2910.
- Ait-Said, L., Zahlane, K., Ghalbane, I., El Messoussi, S., Romane, A., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Lavandula coronopifolia* essential oil against antibiotic-resistant bacteria. *Natural Product Research*, 29(6), 582-585.
- Allan, P., & Bilkei, G. (2005). Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*, 63(3), 716-721.
- Alemaný, D. J. M. (2009). Efectividad de diferentes tratamientos desinfectantes sobre *Salmonella* Typhimurium y la probabilidad de infiltración en tomates hidropónicos durante operaciones de lavado. *Doctoral dissertation*, Universidad de Puerto Rico.
- Aljarallah, K. M., & Adams, M. R. (2007). Mechanisms of heat inactivation in *Salmonella* serotype Typhimurium as affected by low water activity at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 153-160.
- Artuz, M. A., & Restrepo, H. (2002). El aborto inducido. Una visión histórica de su manejo. *Colombia Médica*, 33(2).
- Astorga, R. J., Tümmers, C., Echeita, A., Maldonado, A., Carbonero, A., & Arenas, A. (2007). Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Spain. *Journal of Food Protection*, 70, 1502–1506.

- Astorga, R., Tümmers, C., Echeita, A., Maldonado, A., & Arenas, A. (2005). Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* de origen porcino aislada en mataderos de Andalucía. *Suis*, 24-35.
- Astorga, R., Usera, M. A., Maldonado, A., Arenas, A., Tarradas, C., Luque, I., Pérez, J., & Perea, A. (2002). Marcadores epidemiológicos y sensibilidad antimicrobiana en salmonelas de origen animal. *Avedila*, 21.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722-734.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Balaje, R. M., Sidhu, P. K., Kaur, G., & Rampal, S. (2013). Mutant prevention concentration and PK–PD relationships of enrofloxacin for *Pasteurella multocida* in buffalo calves. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 1114-1124.
- Bartholomew, M. L., Heffernan, R. T., Wright, J. G., Klos, R. F., Monson, T., Khan, S., ... & Deasy, M. P. (2014). Multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype enteritidis infection associated with pet guinea pigs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(6), 414-421.
- Basri, D. F., Xian, L. W., Abdul Shukor, N. I., & Latip, J. (2014). Bacteriostatic antimicrobial combination: antagonistic interaction between epsilon-viniferin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*, 2014, 1-8.

- Bassole, I. H. N., Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989–4006.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. (2001). Common Fragrance and Flavor Materials: preparation, properties and uses. *Wiley-VCH*, Weinheim, 293.
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., & Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(2), 70-76.
- Becerril, R., Nerín, C., & Gómez-Lus, R. (2012). Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(8), 699-705.
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Blasco, A. C., Alfaro, L. A., Reinoso, J. C., Mestre, M. J. G., & Rodríguez-Gascón, A. (2015). Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(1), 48-57.
- Blondeau, J. M. (2009). New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 383-396.
- Bolla, J. M., Alibert-Franco, S., Handzlik, J., Chevalier, J., Mahamoud, A., Boyer, G., & Kieć-Kononowicz, K. (2011). Strategies for bypassing the membrane

- barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 585(11), 1682-1690.
- Boudine, L., Louaste, B., Eloutassi, N., Chami, N., Chami, F., & Remmal, A. (2016). Antifungal activity of oregano essential oil and thymol against some fungi isolated from corn grains. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 17(4), 1120.
- Budzyńska, A., Sadowska, B., Lipowczan, G., Maciąg, A., Kalemba, D., & Różalska, B. (2013). Activity of selected essential oils against *Candida* spp. strains. Evaluation of new aspects of their specific pharmacological properties, with special reference to *Lemon Balm*. *Advances in Microbiology*, 3(04), 317.
- Buranasuksombat, U., Kwon, Y. J., Turner, M., & Bhandari, B. (2011). Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. *Food Science and Biotechnology*, 20(3), 793-800.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Burt, S. A., Vlieland, R., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. (2005). Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*, 68(5), 919-926.
- Cantón, R., Horcajada, J. P., Oliver, A., Garbajosa, P. R., & Vila, J. (2013). Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship

- between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 3-11.
- Canut-Blasco, A., Calvo, J., Rodríguez-Díaz, J. C., & Martínez-Martínez, L. (2016). Informes acumulados de sensibilidad a los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(8), 524-530.
- Carramiñana, J., Rota, C., Agustin, I., & Herrera, A. (2004). High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*, 104, 133-139.
- Chen, H. M., Wang, Y., Su, L. H., & Chiu, C. H. (2013). Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics & Neonatology*, 54(3), 147-152.
- Chen, Q., Andersson, A., Mecklenburg, M., Xie, B. (2015). A biosensing strategy for the rapid detection and classification of antibiotic resistance. *Biosens Bioelectron*, 73, 251-255.
- Chovanová, R., Mezovská, J., Vaverková, Š., & Mikulášová, M. (2015). The inhibition the Tet (K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species. *Letters in Applied Microbiology*, 61(1), 58-62.
- Chueca, B., Berdejo, D., Gomes-Neto, N. J., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2016). Emergence of hyper-resistant *Escherichia coli* MG1655 derivative strains after applying sub-inhibitory doses of individual constituents of essential oils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 273.

- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009): Performance Standards For Antimicrobial Disk-Dilution Susceptibility Tests For Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. M3(8): 28. Wayne, PA: 2009.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. *CLSI supplement VET01S*. Wayne, PA: 2015.
- Coma, J. (2003). Reviews-*Salmonella* control in pork: effect of animal nutrition and feeding. *Pig News and Information*, 24(2), 49N.
- Cornellá, A. S. (2017). Microbiología de los alimentos. *Microbiología*, 2018.
- Crump, J. A., Medalla, F. M., Joyce, K. W., Krueger, L., Hoekstra, R. M., Whichard, J. M., & Barzilay, E. J. Working Grp, NARMS. (2011). Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: national antimicrobial resistance monitoring system, 1996 to 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 1148-1154.
- D'Aoust, J. Y., & Maurer, J. (2007). *Salmonella* species. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition* (pp. 187-236). American Society of Microbiology.
- Da Silva, J. P. L., de Souza, E. F., Della Modesta, R. C., Gomes, I. A., Freitas-Silva, O., & de Melo Franco, B. D. G. (2016). Antibacterial activity of nisin, oregano essential oil, EDTA, and their combination against *Salmonella* Enteritidis for application in mayonnaise. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, 4(1), 83-91.

- Dahiya, S., Kapil, A., Lodha, R., Kumar, R., Das, B. K., Sood, S., & Kabra, S. K. (2014). Induction of resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Typhi under ciprofloxacin selective pressure. *The Indian Journal of Medical Research*, 139(5), 746.
- Dantas, A. D. S., Klein-Júnior, L. C., Machado, M. S., Guecheva, T. N., Santos, L. D. D., Zanette, R. A., ... & Mello, J. R. B. D. (2016). *Origanum majorana* essential oil lacks mutagenic activity in the *Salmonella*/microsome and micronucleus assays. *The Scientific World Journal*, 2016, 1-7.
- Daza, A., Rodríguez, C. A., & Gálvez, J. F. (2001). Efecto de la adición de aceites esenciales al pienso sobre las variables productivas, digestibilidad y balance de nitrógeno en cerdos en cebo. *Investigación Agropecuaria- Producción y Sanidad Animal*, 16, 271-280.
- De Barros, J. C., da Conceição, M. L., Neto, N. J. G., da Costa, A. C. V., Siqueira, J. P., Basílio, I. D., & de Souza, E. L. (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1139-1143.
- De Oliveira, T. L. C., de Araújo Soares, R., & Piccoli, R. H. (2013). A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 93(3), 645-651.
- De Sousa, J. P., de Araújo Torres, R., de Azerêdo, G. A., Figueiredo, R. C. B. Q., da Silva Vasconcelos, M. A., & de Souza, E. L. (2012). Carvacrol and 1, 8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes

- in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 9-13.
- De Toro, M., Seral, C., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., & Sáenz, Y. (2014). Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(1), 4-10.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4863-4870.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2745-2749.
- Díaz-Sánchez, S., D'Souza, D., Biswas, D., & Hanning, I. (2015). Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poultry Science*, 94(6), 1419-1430.
- Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos. *Diario oficial de la Unión Europea*. L(325), 31-40.
- Doran, A. L., Morden, W. E., Dunn, K., & Edwards-Jones, V. (2009). Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 387-392.

- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., ... & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.
- Drlica, K. (2003). The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 11-17.
- Dubois-Brissonnet, F., Naïtali, M., Mafu, A. A., & Briandet, R. (2011). Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by plant-derived terpenes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 906-910.
- Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., ... & Ricke, S. C. (2009). Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*, 15(1), 26-35.
- Dušan, F., Marián, S., Katarína, D., & Dobroslava, B. (2006). Essential oils—their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology In Vitro*, 20(8), 1435-1445.
- Eaves, D. J., Randall, L., Gray, D. T., Buckley, A., Woodward, M. J., White, A. P., & Piddock, L. J. (2004). Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 4012-4015.
- [ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control (2016): EU Protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human

Salmonella and *Campylobacter* isolates Stockholm, SC Jun. *ECDC Journal*, 2016(1), 3.

Echeita, S. M., León, S. H., & Baamonde, C. S. (2011). Invasive gastroenteritis, anything new?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 55-60.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2010). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal*, 8(10), 1-48.

[EFSA] European Food Safety Authority & [ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control. (2016): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 4634, 231.

[EFSA] European Food Safety Authority & [ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control. (2015): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, 13(2), 4036.

Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., & Mount, J. R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1019-1024.

Fabio, A., Cermelli, C., Fabio, G., Nicoletti, P., & Quaglio, P. (2007). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytotherapy Research*, 21(4), 374-377.

- Fadli, M., Chevalier, J., Saad, A., Mezrioui, N. E., Hassani, L., & Pages, J. M. (2011). Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(4), 325-330.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004): Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Departamento de Agricultura, Estudio 162. Directrices. Roma, Italia. *FAO Journal*. 2004.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017): Antimicrobial resistance in food and agriculture. *FAO Journal*. Fcc-EmpresS Information Sheets, (April, 2017), 1-3.
- [FDA] Food and Drug Administration. (2013): National antimicrobial resistance monitoring system enteric bacteria of 2011 in Department of Health and Human Services Rockville, MD-US *Executive Report FDA*, 2013(4), 24-83.
- Folley, S. L., & Lynne, A. M. (2008). Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, 86(14), E173–E187.
- Fonseca, A. O., Pereira, D. I., Botton, S. A., Pötter, L., Sallis, E. S., Júnior, S. F., ... & Baptista, C. T. (2015). Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. *Veterinary Microbiology*, 178(3), 265-269.
- Franz, C., Baser, K. H. C., & Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 327-340.

- Fratini, F., Casella, S., Leonardi, M., Pisseri, F., Ebani, V. V., Pistelli, L., & Pistelli, L. (2014). Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia*, 96, 1-7.
- Freires, I. A., Denny, C., Benso, B., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2015). Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*, 20(4), 7329-7358.
- García, J.A., Cantón, R., Sánchez, J.E., Gómez-Lus, M.L., Martínez, L., Rodríguez-Avial, C., & Vila, J. (2000). Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: *Procedimientos en microbiología clínica*. Edita: *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (España).
- García, P.A. (2008): Analysis of data. In: *Statistics applied: concepts basic*, Ed. 2. (Uned, ed.) National University of Distance Education, Madrid, pp. 567-569.
- Gibbons, S. (2008). Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 74(06), 594-602.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5750-5755.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 170-174.

- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., & Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1), 83-92.
- Gómez-Laguna, J., Hernández, M., Creus, E., Echeita, A., Otal, J., Herrera-León, S., & Astorga, R. J. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs. *Veterinary Journal*, 190(1), 16-18.
- González-Zorn, B., Goyache, J., & Domínguez, L. (2004). El destino de *Salmonella* en el interior de un ser vivo. *Porci*, (81), 23-28.
- Grau, S., Marín, M., Álvarez, F., Company, D., Gimeno-Bayón, J., Saballs, P., Drobnic, L., Saballs, M. (2005). Antimicrobianos. *Farmacia Hospitalaria*, 29(5), 147-208.
- Griffin, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (2000). An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 249-255.
- Gutiérrez, J. (2006). Estudio de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a diferentes serotipos de *Salmonella* spp. Tesina de Licenciatura de Veterinaria, Universidad de Córdoba - España.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
- Helke, K. L., McCrackin, M. A., Galloway, A. M., Poole, A. Z., Salgado, C. D., & Marriott, B. P. (2017). Effects of antimicrobial use in agricultural animals on drug-resistant foodborne salmonellosis in humans: A systematic

- literature review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 472-488.
- Hemaiswarya, S., & Doble, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, 16(11), 997-1005.
- Henn, J. D., Bertol, T. M., Moura, N. F. D., Coldebella, A., Brum, P. A. R. D., & Casagrande, M. (2010). Oregano essential oil as food additive for piglets: antimicrobial and antioxidant potential. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(8), 1761-1767.
- Herman, A., Herman, A. P., Domagalska, B. W., & Młynarczyk, A. (2013). Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2), 232-237.
- Hernández, M. (2013). Estudio de evaluación y mejora de la sanidad y seguridad alimentaria del ganado porcino ibérico: seguimiento de *Salmonella* en la cadena de producción. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba - España.
- Hernández, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J., & Megias, M. D. (2004). Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, 83(2), 169-174.
- Herrera Uribe, J. (2017). Integrated analysis of miRNA expression in response to *Salmonella* Typhimurium infection in pigs. Doctoral dissertation, University of Cordoba – Spain.

- Hew, C. M., Hajmeer, M. N., Farver, T. B., Glover, J. M., & Cliver, D. O. (2005). Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in chorizos. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2039-2046.
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 358-373.
- Hossain, S. Z., Bojko, B., & Pawliszyn, J. (2013). Automated SPME–GC–MS monitoring of headspace metabolomic responses of *E. coli* to biologically active components extracted by the coating. *Analytica Chimica Acta*, 776, 41-49.
- Huerta, B., Gutiérrez, J., Astorga, R., Borge, C., Carbonero, A., García, I. y Perea, A. (2004). Actividad *in vitro* de 27 aceites esenciales frente a cepas de *Salmonella enterica* subsp *enterica* serotipos Enteritidis y Typhimurium. IX Simposio Anual Avedila. Córdoba - España.
- Huerta, B., Ponsa, F., Ordóñez, G., Fernández, N., Peñalver, P. (2005). Estudio de eficacia de aceites esenciales ante una infección experimental de *Salmonella* Enteritidis en gallinas ponedoras en producción. XLII Simposium Científico de Avicultura. Cáceres - España.
- Huerta, B., Barrero-Dominguez, B., Galán-Relaño, A., Tarradas, C., Maldonado, A., & Luque, I. (2016). Essential oils in the control of infections by *Staphylococcus xylosus* in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 38, 19-23.
- Idoate, A., & Idoipe, A. (2002). Investigación y ensayos clínicos. *Farmacia hospitalaria*, 1, 325-344.

- Isabel, B., & Santos, Y. (2009). Efectos de los aceites esenciales en la alimentación de los pollos de carne. *Archivos de Zootecnia*, 58(1).
- Jakhetia, V., Patel, R., Khatri, P., Pahuja, N., Garg, S., Pandey, A., & Sharma, S. (2010). Cinnamon: a pharmacological review. *Journal of Advanced Scientific Research*, 1(2), 19-23.
- Jamroz, D., Orda, J., Kamel, C., Wiliczekiewicz, A., Wiertelicki, T., & Skorupinska, J. (2003). The influence of phytogetic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, and gut microbial status in broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 12(3), 583-596.
- Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A., & Ray, B. (2004). Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 91-98.
- Knezevic, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A., & Mimica-Dukic, N. (2016). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 125-136.
- Köck, R., & Kreienbrock, L. (2017). Antimicrobial resistance at the interface of human and veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 200(2), 1-5.
- Kollanoor-Johny, A. K., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. (2010). Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the

- sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 1165–70.
- Kon, K. V., & Rai, M. K. (2012). Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(7), 775-790.
- Kwon, S. J., Chang, Y., & Han, J. (2017). Oregano essential oil-based natural antimicrobial packaging film to inactivate *Salmonella enterica* and yeasts/molds in the atmosphere surrounding cherry tomatoes. *Food Microbiology*, 65, 114-121.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., & Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1), 76-94.
- Lee, S. J., Awji, E. G., Park, N. H., & Park, S. C. (2016). Evaluation of fluoroquinolone activity against emergence of resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using *in vitro* dynamic models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-01756-16.
- Lee, S. J., Awji, E. G., Park, N. H., & Park, S. C. (2017). Using *in vitro* dynamic models to evaluate fluoroquinolone activity against emergence of resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), e01756-16.

- Lis-Balchin, M., & Hart, S. (1999). Studies on the mode of action of the essential oil of *Lavender (lavandula angustifolia)* P. Miller. *Phytotherapy Research*, 13(6), 540-542.
- Liu, S., Hou, Y., Chen, X., Gao, Y., Li, H., & Sun, S. (2014). Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(5), 395-402.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Maisanaba, S., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, A., Moyano, R., & Cameán, A. M. (2017). A subchronic 90-day oral toxicity study of *Origanum vulgare* essential oil in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 101, 36-47.
- Lopes, P. D., Neto, O. F., Batista, D. F. A., Denadai, J., Alarcon, M. F. F., Almeida, A. M., & Berchieri, A. (2016). Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. *The Veterinary Journal*, 214, 40-46.
- López, M. A., Gregorio, E. V., Cota, L. Q., Figueroa, G. M., Cruz, S. R., García, J. C., ... & Rodríguez, D. P. (2017). Efecto de microemulsiones de aceites esenciales sobre el eritrocito humano y bacterias patógenas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 247-254.
- Loynichan, A. T., & Harris, D. L. (2005). Infectious dose determination of acute *Salmonella* infection in swine. *Animal Industry Report*, 651(1), 44.
- Luz, I., Neto, N. J. G., Tavares, A. G., Nunes, P. C., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2012). Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory

- amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 5021-5024.
- Luz, I. D. S., de Melo, A. N. F., Bezerra, T. K. A., Madruga, M. S., Magnani, M., & de Souza, E. L. (2014). Sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella* Typhimurium cultivated in a meat broth. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5), 357-361.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011). *In vitro* antimicrobials effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four foodrelated microorganisms. *Food Research International*, 44, 3057e3064.
- MacGowan, A. P., & Wise, R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl 1), 17-28.
- Madeira, S. V., Matos, F. J. A., Leal-Cardoso, J. H., & Criddle, D. N. (2002). Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 1-4.
- [MAPAMA] Ministry of Agriculture, Food and Environment of Spain. (2016): Government of Spain, national programs animal control in specific populations, *Salmonella* control programs in animal health: Salmonellosis control in breeding birds of the species *Gallus gallus*. *Control Plans Reports*, 8, 1-2.

- [MAPAMA] Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, (2014): Informe de Zoonosis y Resistencias Antimicrobianas. *Informes Planes de Control*, 5, 3-13.
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'brien, S. J., ... & International Collaboration on Enteric Disease “Burden of Illness” Studies. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882-889.
- Marchetti, M. L., Errecalde, J. O., & Mestorino, O. N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. *Analecta Veterinaria*, 31(1), 40-53.
- Martínez, J., Pacheco, M., Rada, I. (2013). Comparison of the minimal inhibitory concentration and the plasma cephalotin concentration through a mathematical model. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 47(2):213-224
- Martínez, R. M., Cerrilla, M. E. O., Haro, J. G. H., Garza, J. R. K., Ramos, J. J. Z., & Robles, R. S. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia*, 40(11), 744.
- Martins da Costa, P., Oliveira, M., Bica, A., Vaz-Pires, P., & Bernardo, F. (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Veterinary Microbiology*, 120(1-2), 122–131.
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains

- with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3), 167-173.
- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., & Serio, A. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794-803.
- Migliorati, M. (2017). Sin animales sanos, la salud del hombre no es posible. RIA. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 43(1), 20-23.
- Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., & Chaieb, K. (2017). Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial Pathogenesis*, 104, 56-63.
- Miro, E., Verges, C., Garcia, I., Mirelis, B., Navarro, F., Coll, P., ... & Martinez-Martinez, L. (2004). Resistance to quinolones and beta-lactams in *Salmonella enterica* due to mutations in topoisomerase-encoding genes, altered cell permeability and expression of an active efflux system. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 204-211.
- Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition*, 2(4), 403-416.
- Mitsch, P., Zitterl-Eglseer, K., Köhler, B., Gabler, C., Losa, R., & Zimpf, I. (2004). The effect of two different blends of essential oil components on the

- proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science*, 83(4), 669-675.
- Monte, D. F., Tavares, A. G., Albuquerque, A. R., Sampaio, F. C., Oliveira, T. C., Franco, O. L., ... & Magnani, M. (2014). Tolerance response of multidrug-resistant *Salmonella enterica* strains to habituation to *Origanum vulgare* L. essential oil. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-5.
- Moon, S. E., Kim, H. Y., & Cha, J. D. (2011). Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 56(9), 907-916.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648-56.
- Montravers, P., & Dupont, H. (1996). Monitorage d'une antibiothérapie. *Conférences D'actualisation*, 651-668.
- Moraes-Lovison, M., Marostegan, L. F., Peres, M. S., Menezes, I. F., Ghiraldi, M., Rodrigues, R. A., ... & Pinho, S. C. (2017). Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 233-240.
- Mourey, A., & Canillac, N. (2002). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13(4), 289-292.

- Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., Rahman, M., Hameed, S., ... & Iqbal, M. (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 265.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- Noda Albelo, A. L., & Vidal Tallet, A. (2010). Farmacocinética y farmacodinámica, implicación en un uso más racional de los antimicrobianos: implication in a more rational use of antimicrobials. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(4), 533-546.
- Nordqvist, H., Nilsson, L. E., & Claesson, C. (2016). Mutant prevention concentration of colistin alone and in combination with rifampicin for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(11), 1845-1850.
- Núñez-Núñez, M., Navarro, M. D., Gkolia, P., Rajendran, N. B., Del Toro, M. D., Voss, A., ... & Rodríguez-Baño, J. (2017). Los sistemas de vigilancia de las instituciones de salud pública y las Sociedades Científicas de resistencia a los antimicrobianos y Salud infecciones asociadas en Europa (Suspiro): Protocolo para una revisión sistemática. *BMJ Open*, 7(3), e014538.
- O'Bryan, C. A., Pendleton, S. J., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2015). Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture—*in vitro*

studies on antibacterial mode of action. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 1-8.

Obaidat, M. M., Al-Zyoud, A. A., Salman, A. B., & Davis, M. A. (2017). Antimicrobial use and resistance among commensal *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in rural Jordan small ruminant herds. *Small Ruminant Research*, 149, 99-104.

[OIE] Office International des Épizooties. (2008): Harmonisation of national antimicrobial resistance surveillance and monitoring programmes, Zoonotic bacteria. Terrestrial Animal Health Code, Chapter 6.5, 207-210.

[OIE] Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health. (2016): The OIE strategy on antimicrobial resistance and the prudent use of antimicrobials. *OIE Report*, 11, 7-12.

[OIE] Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health. (2017): Listed diseases, infections and infestations in force in 2017. www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/(accessed Feb 2017).

Olofsson, S. K., Marcusson, L. L., Komp Lindgren, P., Hughes, D., & Cars, O. (2006). Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an *in vitro* kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), 1116-1121.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. (2016): Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. *OMS Report*, (4), 1-30. ISBN 978 92 4 350976 1.

- Opalchenova, G., & Obreshkova, D. (2003). Comparative studies on the activity of basil—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.—against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological Methods*, 54(1), 105-110.
- Oyedemi, S. O., Okoh, A. I., Mabinya, L. V., Pirochenva, G., & Afolayan, A. J. (2009). The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 8(7).
- Padalia, H., Moteriya, P., Baravalia, Y., & Chanda, S. (2015). Antimicrobial and synergistic effects of some essential oils to fight against microbial pathogens-a review. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, *Edition A. Mendez-Vilas*, 34-35.
- Pang, T., Levine, M. M., Ivanoff, B., Wain, J., & Finlay, B. B. (1998). Typhoid fever—important issues still remain. *Trends in Microbiology*, (April 1998), 131–133, ISSN 0966-842X.
- Papadopoulos, C. J., Carson, C. F., Chang, B. J., & Riley, T. V. (2008). Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1, 8-cineole, and α -terpineol. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1932-1935.
- Pasquali, F., & Manfreda, G. (2007). Mutant prevention concentration of

- ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*. *Veterinary Microbiology*, 119(2), 304-310.
- Peinado-Guevara, H., Green-Ruíz, C., Herrera-Barrientos, J., Escolero-Fuentes, O., Delgado-Rodríguez, O., Belmonte-Jiménez, S., & Ladrón de Guevara, M. (2012). Relationship between chloride concentration and electrical conductivity in groundwater and its estimation from vertical electrical soundings (VESs) in Guasave, Sinaloa, Mexico. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(1), 229-239.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Teglia, C. M., Martinuzzi, C., ... & Goicoechea, H. C. (2017). Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 51, 114-123.
- Peñalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., & Perea, A. (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 113, 1-6.
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808-811.
- Picone, G., Laghi, L., Gardini, F., Lanciotti, R., Siroli, L., & Capozzi, F. (2013). Evaluation of the effect of carvacrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using ¹H-NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 141(4), 4367-4374.

- Pires, S. M., Vigre, H., Makela, P., & Hald, T. (2010). Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(11), 1351-1361.
- Qiu, J., Feng, H., Lu, J., Xiang, H., Wang, D., Dong, J., ... & Deng, X. (2010). Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5846-5851.
- Radhakrishnan, N., Gnanamani, A., & Mandal, A. B. (2011). A potential antibacterial agent Embelin, a natural benzoquinone extracted from *Embelia ribes*. *Biology and Medicine*, 3(2), 1-7.
- Rajkowska, K., Kunicka-Styczyńska, A., & Maroszyńska, M. (2017). Selected essential oils as antifungal agents against antibiotic-resistant *Candida* spp.: in vitro study on clinical and food-borne isolates. *Microbial Drug Resistance*, 23(1), 18-24.
- Randall, L. P., Coldham, N. G., & Woodward, M. J. (2005). Detection of mutations in *Salmonella enterica* *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) using standard HPLC instrumentation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(4), 619-623.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Piddock, L. J. V., & Woodward, M. J. (2004). Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin and enrofloxacin for *Salmonella enterica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(3), 688-691.
- Randall, L., Ridley, A., Lemma, F., Hale, C., & Davies, R. (2016). *In vitro*

investigations into the use of antimicrobials in combination to maintain efficacy of fluoroquinolones in poultry. *Research in Veterinary Science*, 108, 47-53.

Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum*) oil against *Salmonella* Enteritidis *in vitro* and in food. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(6), 1200-1204.

Reglamento 1831/2003/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre, sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario oficial de la Unión Europea*. L(268), 29–43.

Reglamento 2160/2003/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre, sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. *Diario oficial de la Unión Europea*. L(325), 1-15.

Rodríguez-Baño, J., Paño-Pardo, J. R., Alvarez-Rocha, L., Asensio, Á., Calbo, E., Cercenado, E., ... & Grau, S. (2012). Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(1), 22-e1.

Rodríguez-García, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., ... & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717-1727.

- Rodríguez-Martínez, J. M., Ballesta, S., & Pascual, Á. (2007). Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(4), 366-368.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., & Milillo, M. A. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14(11), 727-732.
- Ross, Z. M., O'Gara, E. A., Hill, D. J., Sleightholme, H. V., & Maslin, D. J. (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 475-480.
- Rota, C., Carramiñana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004). *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1252-1256.
- Ruiz-Barba, J. L., Maldonado, A., & Jiménez-Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 333-335.
- Ryan, M. P., Dillon, C., & Adley, C. C. (2011). Nalidixic acid-resistant strains of *Salmonella* showing decreased susceptibility to fluoroquinolones in the midwestern region of the Republic of Ireland due to mutations in the *gyrA* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 2077-2079.
- Ryan, M. P., O'Dwyer, J., & Adley, C. C. (2017). Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International*, 2017, 1-6.

- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43, 547-556.
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: determination of optimal extraction parameters. *Journal of Food Protection*, 69(2), 369-375.
- Sarac, N., & Ugur, A. (2008). Antimicrobial activities of the essential oils of *Origanum onites* L., *Origanum vulgare* L. subspecies *hirtum* (Link) Ietswaart, *Satureja thymbra* L., and *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal. growing wild in Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 11(3), 568-573.
- Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y., & Miller, R. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1394-1404.
- Scheld, W. M. (2003). Maintaining fluoroquinolone class efficacy: review of influencing factors. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 1.
- Schlundt, J., Toyofuku, H., Jansen, J., & Herbst, S. A. (2004). Emerging food-borne zoonoses. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 23(2), 513-534.
- Schwarz, S., Loeffler, A., & Kadlec, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 82.

- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A. P., & Gastra, W. (2010). Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4), 601-604.
- Serra-Valdés, M. Á. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419.
- Shaaban, H. A., El-Ghorab, A. H., & Shibamoto, T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 203-212.
- Shahverdi, A. R., Monsef-Esfahani, H. R., Tavasoli, F., Zaheri, A., & Mirjani, R. (2007). Trans-Cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* Bark Essential Oil Reduces the Clindamycin Resistance of *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Food Science*, 72(1), S55–58.
- Si, H., Hu, J., Liu, Z., & Zeng, Z. L. (2008). Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Pathogens and Disease*, 53(2), 190-194.
- Sienkiewicz, M., Kowalczyk, E., & Wasiela, M. (2012). Recent patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(2), 133-140.
- Silva, N., Alves, S., Gonçalves, A., Amaral, J. S., & Poeta, P. (2013). Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants

- against several foodborne and spoilage bacteria. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 19(6), 503-510.
- Silveira, E. A., González García, O., & Medina Marrero, R. (2005). Actividad *in vitro* 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 6(10).
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & van Griensven, L. J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15(11), 7532-7546.
- Solarte, A. L.** (2016). Aplicación de aceites esenciales para el control de *Salmonella* Typhimurium aislada de casos clínicos en diferentes especies animales. Trabajo de Fin de Máster (MSMA), Universidad de Córdoba - España.
- Solarte, A. L.**, Astorga, R. J., Aguiar, F., Galán-Relaño, Á., Maldonado, A., & Huerta, B. (2017). Combination of antimicrobials and essential oils as an alternative for the control of *Salmonella enterica* multiresistant strains related to foodborne disease. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(10), 558-563.
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136-141.
- Sperotto, A. R. M., Moura, D. J., Péres, V. F., Damasceno, F. C., Caramão, E. B., Henriques, J. A. P., & Saffi, J. (2013). Cytotoxic mechanism of *Piper*

- gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 57-68.
- Switt, A. I. M., Soyer, Y., Warnick, L. D., Wiedmann, M. (2009). Emergence, distribution and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:. *Foodborne Pathogens and Disease*, (5), 407–415.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199-1218.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2013). Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering*, 117(3), 350-360.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., ... & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- Ünal, K., Babaoglu, A. S., & Karakaya, M. (2014). Effect of oregano, sage and rosemary essential oils on lipid oxidation and color properties of minced beef during refrigerated storage. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5), 797-805.
- Vázquez-Aguilar, M. M. (2007). Fundamentos de la determinación de parámetros

- cinéticos para microorganismos de interés en tratamiento térmico de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 1, 1-14.
- Vagi, E., Simandi, B., Suhajda, A., & Hethelyi, E. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 38(1), 51-57.
- Van-Vuuren, S., & Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 77(11), 1168-1182.
- Vetvicka, V., & Vetvickova, J. (2016). Essential Oils from Thyme (*Thymus vulgaris*): Chemical Composition and Biological Effects in Mouse Model. *Journal of Medicinal Food*, 19(12), 1180-1187.
- Walia, K., Argüello, H., Lynch, H., Leonard, F. C., Grant, J., Yearsley, D., ... & Lawlor, P. G. (2017). Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 137, 28-35.
- Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11.
- Wenk, C. (2006). Are herbs, botanicals and other related substances adequate replacements for antimicrobial growth promoters. *Antimicrobial Growth Promoters*, 329-340.

- [WHO] World Health Organization. (2017). *Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use*. World Health Organization.
- Williams, P., & Losa, R. (2002). Blending essential oils for poultry. *Feed Mix*, 10(3), 8-9.
- Williams, P. G., Stirling, E., & Keynes, N. (2004). Food fears: a national survey on the attitudes of Australian adults about the safety and quality of food. *University of Wollongong*, RIS ID 10892.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86(14_suppl), E140-E148.
- Woehrlin, F., Fry, H., Abraham, K., & Preiss-Weigert, A. (2010). Quantification of flavoring constituents in cinnamon: high variation of coumarin in cassia bark from the German retail market and in authentic samples from Indonesia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10568-10575.
- Yan, L., Wang, J. P., Kim, H. J., Meng, Q. W., Ao, X., Hong, S. M., & Kim, I. H. (2010). Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower–finisher pigs. *Livestock Science*, 128(1), 115-122.

- Yap, P. S. X., Lim, S. H. E., Hu, C. P., & Yiap, B. C. (2013). Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*, 20(8), 710-713.
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8, 6.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABT	Antibiótico(s)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Aceite esencial(s)
AGP	Antibióticos promotores del crecimiento (Antibiotics growth promoters)
AMB	Antimicrobiano(s)
AMR	Resistencia a los antimicrobianos
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
a_w	Actividad agua
(C)	Carbón base
CE	Comunidad europea
CEF	Ceftiofur
CIF	Concentración Inhibitoria Fraccional
CIFI	Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMI _c	Concentración Mínima Inhibitoria Combinada
CMI _i	Concentración Mínima Inhibitoria Individual
MPC	Concentración de Prevención de Mutantes

CR	Cepa de referencia
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (European Centre for Disease Prevention and Control)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
EM	Estados miembros
ENR	Enrofloxacina
EPA	Efecto post-antibiótico
ETA	Enfermedad(es) Transmitida(s) por Alimentos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration)
GRAS	Generalmente reconocidos como agentes seguros
<i>gyrA</i>	ADN girasa subunidad A
<i>gyrB</i>	ADN girasa subunidad B
I+D	Investigación y desarrollo
IPP	Isopentenil difosfato
LCV	Laboratorio Central de Veterinaria (Algete, Madrid)
LNRSSSE	Laboratorio Nacional de Referencia de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>
MAPAMA	Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España

MDR	Resistentes a múltiples fármacos (Multiple Drug Resistance)
MEOR	Multiple Essential Oil Resistance
MH	Müller-Hinton
NARMS	Sistema Nacional de Monitoreo de la Resistencia a los Antimicrobianos
OIE	Organización Mundial de la Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
<i>parC</i>	Topoisomerasa IV subunidad C
<i>parE</i>	Topoisomerasa IV subunidad E
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Farmacodinámica
PK	Farmacocinética
PNR	Patrón no reconocido
NT	No tipable
<i>QRDR</i>	Región determinante de resistencia a las quinolonas
REDOX	Reacciones de reducción y oxidación
SCAI	Servicio Central de Apoyo a la Investigación
SGI1	Isla genómica de <i>Salmonella</i> tipo 1
SNC	Sistema nervioso central
spp.	Sin especie
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TSA	Tripticasa soja agar
UE	Unión Europea

UFC	Unidades formadoras de colonias
VSM	Ventana de selección de mutantes
<i>wt</i>	Tipo salvaje (wild type)
XLD	Xilosa lisina desoxicolato agar

Composición AE de canela

c/ Verdi 321 bx. 2º 08024 Barcelona
Tf.: 93-2840606 email: info@aromium.es

22.05.2017

CHROMATO**PRODUCT :** CINNAMON BARK OIL – CANNE0013 (Standard)

COMPONENTS	PERCENTAGES (%)
ALPHA PINENE	1.36%
ALPHA PHELLANDRENE	1.32%
PARACYMENE	1.49%
BETA PHELLANDRENE + CINEOL 1,8	1.85%
LINALOL	3.19%
BETA CARYOPHYLLENE	4.54%
ALDEHYDE CINNAMIQUE	69.18%
ACETATE CINNAMYLE	1.98%
EUGENOL	3.03%

Composición AE de clavo

Material security data sheet

Printed : 20/09/2013

CLOVE BUD OIL - GIROF0008

Review : 001NEW-5-CLP du 20/09/2016

H304 - May be fatal if swallowed and enters airways.
 H317 - May cause an allergic skin reaction.
 H319 - Causes serious eye irritation.

P261 - Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
 P264 - Wash ... thoroughly after handling.
 P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
 P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 P301+P310 - IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.
 P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.



Conform with UE 67/548/CEE et 1999/45/CE :

- Health Hazards : Xn
 R36:Irritating to eyes.
 R43:May cause sensitization by skin contact.
 R65:Harmful: May cause lung damage if swallowed.

S24:Avoid contact with skin.
 S37:Wear suitable gloves.
 S62:If swallowed, do not induce vomiting: seek medical advice immediately and show this container or label.



2.3. Other hazards

NOT RELEVANT

3. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENT

Component list :

3.1. Substances

Material	C.A.S	EINECS	Risk Symbol	Classification GHS	Percent %
Eugenol	97-53-0	202-589-1	Xi R36 R43	ED12, SS1 - H317, H319	[85-90]
Eugenyl Acetate	93-28-7	202-235-6	Xn R22	ATO4 - H302, H316	[5-10]
Caryophyllène	87-44-5	201-746-1	Xn R65	AH1 - H304	[0-5]

3.2. Mixtures

NOT RELEVANT

4. FIRST AID MEASURES

4.1. Description of first aid measures

NOT RELEVANT

4.2. Most important symptoms and effects, both acute and delayed

NOT RELEVANT

2/6

Composición AE de orégano

20.06.2013

CHROMATO**PRODUCT : ORIGANUM OIL – LOT.130006133**

COMPONENTS	PERCENTAGES (%)
ALPHA THUYENE	1.50%
MYRCENE	2.08%
ALPHA TERPINENE	1.42%
GAMMA TERPINENE	8.11%
PARACYMENE	5.01%
CARYOPHYLLENE	2.24%
THYMOL	10.56%
CARVACROL	63.01%

Composición AE de tomillo rojo

22.05.2017

CHROMATO**PRODUCT : THYM RED OIL – THYM0002**

COMPONENTS	PERCENTAGES (%)
ALPHA THUYENE	1.09%
ALPHA PINENE	1.48%
MYRCENE	1.71%
ALPHA TERPINENE	1.84%
GAMMA TERPINENE	9.32%
PARACYMENE	21.72%
LINALOL	4.80%
BETA CARYOPHYLLENE	1.64%
BORNEOL	1.24%
THYMOL	46.90%
CARVACROL	2.30%

Anexo 2. Resultados del estudio *in vitro* de susceptibilidad de las 85 cepas de *S. enterica* a los aceites esenciales estudiados (Concentración Mínima Inhibitoria µg/mL CMI y Concentración Mínima Bactericida CMB µg/mL). Descripción de la mediana estimada y del valor máximo obtenido en los 3 ensayos.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
1	1	2500	5000	1250	1250	2500	2500	312,5	312,5	2500	2500
	2	1250	5000	1250	1250	1250	1250	1250	1250	2500	2500
	3	1250	5000	1250	2500	1250	1250	2500	2500	2500	2500
Mediana		1250	5000	1250	1250	1250	1250	1250	1250	2500	2500
Máximo		2500	5000	1250	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
2	1	2500	5000	1250	2500	2500	5000	5000	10000	2500	5000
	2	2500	5000	1250	2500	2500	2500	5000	10000	2500	5000
	3	2500	2500	2500	2500	2500	5000	5000	10000	2500	5000
Mediana		2500	5000	1250	2500	2500	5000	5000	10000	2500	5000
Máximo		2500	5000	2500	2500	2500	5000	5000	10000	2500	5000
3	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
4	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
5	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
6	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	625	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	625	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
7	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
8	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
9	1	625	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	625	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	625	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		625	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		625	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
10	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	156,25	156,25
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
11	1	1250	1250	1250	1250	156,25	625	312,5	1250	312,5	312,5
	2	1250	1250	625	625	156,25	625	312,5	1250	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	625	312,5	625	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	625	625	156,25	625	312,5	1250	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	625	312,5	1250	312,5	312,5
12	1	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	1250	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	1250	312,5	312,5

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
13	1	1250	1250	625	625	312,5	312,5	156,25	156,25	312,5	312,5
	2	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	312,5	312,5	156,25	156,25	156,25	156,25	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	156,25	156,25	312,5	312,5
		1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
14	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	625	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	625	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	625	312,5	312,5
		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	625	312,5	312,5
15	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
16	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	625	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	625	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	625	312,5	312,5
		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5
17	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5
		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5
18	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
19	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
20	1	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	312,5	312,5
	3	1250	1250	625	1250	625	625	625	625	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
21	1	1250	1250	1250	1250	625	625	625	1250	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	625	1250	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	625	1250	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	625	1250	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	625	1250	625	625
22	1	1250	2500	625	2500	312,5	625	625	1250	312,5	1250
	2	1250	2500	625	2500	312,5	625	625	1250	312,5	1250
	3	1250	2500	625	2500	312,5	625	625	1250	312,5	1250
Mediana		1250	2500	625	2500	312,5	625	625	1250	312,5	1250
Máximo		1250	2500	625	2500	312,5	625	625	1250	312,5	1250
24	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
25	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
26	1	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
27	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
28	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
29	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
30	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
31	1	312,5	625	1250	2500	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	312,5	625	1250	2500	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	312,5	625	1250	2500	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		312,5	625	1250	2500	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		312,5	625	1250	2500	312,5	312,5	625	625	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
32	1	312,5	312,5	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	312,5	312,5	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		312,5	312,5	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
33	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	1250
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	1250
34	1	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	625	625	625	625
35	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	1250	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	1250	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	1250	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	1250	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	1250	625	625
36	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
37	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
39	1	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
40	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
41	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
42	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
43	1	625	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
45	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
46	1	312,5	312,5	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	312,5	312,5	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	312,5	312,5	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		312,5	312,5	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		312,5	312,5	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
47	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
52	1	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
53	1	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
54	1	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
55	1	312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
	2	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
56	1	312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		312,5	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
57	1	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
Mediana		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
58	1	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
Mediana		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		312,5	312,5	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	625
59	1	312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		312,5	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
60	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	1250
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	1250
61	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
62	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	625	625	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
63	1	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
64	1	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
65	1	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
68	1	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
70	1	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	625	625
	3	625	1250	625	625	625	625	312,5	625	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
73	1	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
81	1	625	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	625	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	625	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		625	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		625	1250	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
82	1	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
83	1	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
84	1	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
86	1	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
87	1	625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
88	1	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
89	1	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
91	1	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
92	1	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
93	1	625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	625	625	625	625	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
94	1	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	312,5	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	312,5	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	312,5	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	312,5	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	312,5	625	312,5	625
95	1	1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
96	1	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
97	1	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
98	1	625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	2	625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	3	625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
99	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	625	625	625	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
100	1	625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	2	625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
	3	625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	625	625	312,5	312,5	625	625
101	1	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
102	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
103	1	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	2	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
	3	625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Mediana		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
Máximo		625	1250	1250	1250	625	625	625	625	625	625
104	1	1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5
	2	1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5
	3	1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5
Mediana		1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5
Máximo		1250	1250	1250	1250	625	625	312,5	312,5	312,5	312,5
23 7162	1	625	1250	625	1250	312,5	625	625	1250	312,5	625
	2	625	1250	625	1250	312,5	625	625	1250	312,5	625
	3	625	1250	625	1250	312,5	625	625	1250	312,5	625
Mediana		625	1250	625	1250	312,5	625	625	1250	312,5	625
Máximo		625	1250	625	1250	312,5	625	625	1250	312,5	625

Anexo 2. Continuación.

CEPA	ENSAYO	Canela		Clavo		Orégano		Tomillo común		Tomillo rojo	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
51 ATCC14028	1	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
	2	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
	3	625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
Mediana		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
Máximo		625	625	1250	1250	312,5	312,5	312,5	312,5	625	625
85 cepas	Total	Mediana	625	1250	1250	1250	1250	312,5	312,5	625	625
		Máximo	2500	5000	2500	2500	2500	2500	5000	10000	5000

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (ESPAÑA)



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

